
A mikropartikulumok laboratóriumi diagnosztikája

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Tőkés-Füzesi Margit

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof. Dr. Mezősi Emese

Témavezetők: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Dr. Molnár Tihamér



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs, 2019

Tartalom

Rövidítés jegyzék	3
1. Bevezetés	5
1.1. Szubjektív előzmények és indíttatás	5
1.2. Mikropartikulumok - rövid történeti áttekintés	6
1.3. A mikrovezikulumok típusai	7
1.3.1. Az exosomák	8
1.3.2. Apoptotikus testek	10
1.3.3. A mikropartikulumok	10
1.3.3.1. A mikropartikulumok kialakulása	11
1.3.3.2. A mikropartikulumok membránfehérjéi	13
1.3.3.3. A mikropartikulumok életideje a keringésben	14
1.3.3.4. A mikropartikulumok szerepe	15
1.3.3.4.a. A mikropartikulumok hemosztázisban betöltött szerepe	15
1.3.3.4.b. A mikropartikulumok és a gyulladás	16
1.3.3.4.c. Mikropartikulumok és a betegségek	18
1.3.3.5. A mikropartikulumok kimutatására használt módszerek	19
2. Célkitűzések	21
3. Anyag és módszer	22
3.1. Mintakezelés	22
3.2. A mikropartikulumok izolálása	23
3.3. A mikropartikulumok mérése	24
3.3.a. A CD markerek és fluoreszcens jelölések kiválasztása	27
3.3.b. A mikropartikulum méretkapu meghatározása	27
3.3.c. A mikropartikulum méretkapun belül az AnnexinV pozitív mikropartikulumok meghatározása	29
3.3.d. A fluoreszcensen jelölt CD markerek optimális jelölési koncentrációjának meghatározása és a mikropartikulumok jelölése	30
3.4. Pozitív és negatív kontroll mérése	31
3.5. Reprodukálhatóság	32
3.6. A mintavételtől eltelt idő befolyása a mért mikropartikulum mennyiségekre	34
4. A módszer alkalmazása betegeken	35

4.1. Kontroll csoport kialakítása, referencia tartomány számítás, a módszer tesztelése	35
4.2. A módszer tesztelése betegeken	38
4.2.1. Szeptikus betegcsoport	38
4.2.1.a. A beteg csoport kialakítása	38
4.2.1.b. Statisztikai analízis	39
4.2.1.c. Eredmények	40
4.2.2. A krónikus obstruktív tüdőbeteg (COPD-s) csoport	43
4.2.2.1. Prospektív vizsgálat COPD-s betegek	43
4.2.2.1.a. A beteg csoport kialakítása	43
4.2.2.1.b. Statisztikai analízis	44
4.2.2.1.c. Eredmények	44
4.2.2.2. Retrospektív vizsgálat a COPD-s betegcsoportban	47
4.2.2.2.a. Statisztikai analízis	48
4.2.2.2.b. Eredmények	48
5. Megbeszélés, a vizsgálati eredmények értékelése	54
5.1. Kontroll csoport, referencia tartomány	54
5.2. Szeptikus betegcsoport	56
5.3. COPD-s betegcsoport, prospektív és retrospektív vizsgálat	58
6. Új megállapítások	67
7. Irodalom jegyzék	69
8. Köszönetnyilvánítás	86
9. Közlemények jegyzéke	87

Rövidítés jegyzék

AB – apoptotikus test

ACE – angiotenzin konvertáló enzim

AECOPD – krónikus obstruktív tüdőbetegség akut exacerbáció

APS - antifosfolipid szindróma

ATP - adenzin-5'-trifoszfát

BALF - broncho-alveoláris mosófolyadék

CD – cluster of differentiation

COPD – krónikus obstruktív tüdőbetegség

CRP – C-reaktív protein

CTAD - citrat-theophilin-adenosin-dipiridamol

CVD – kardiovaszkuláris betegség

Cy5 – Cychrom5 (PE-Cy5 konjugátum)

DIC – disszeminált intravaszkuláris koaguláció

EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav

EMP – endotél eredetű mikropartikulum

FEV1 - az első mp.-ben mért térfogat erőltetett kilégzés közben

FITC - fluoreszcein izothyocianát

FS – forward scatter (átmenő szórt fény)

FVC - erőltetett kilégzési vitálkapacitás

HUVEC - humán umbilikális endoteliális sejt

Ig – immunglobulin

ISTH SSC – International Society of Thrombosis and Haemostasis Standardisation sub Comitee

LPS – lipopoliszaharid

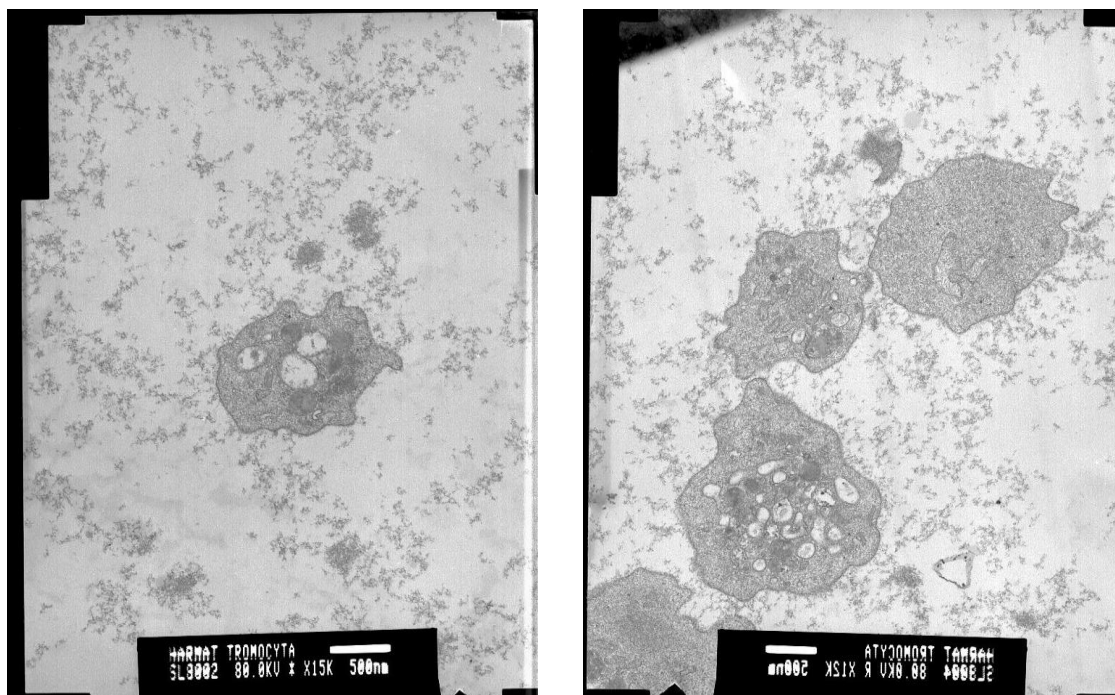
MB – microbead (mikrogyöngy)

MHC-I – major hystocompatibility class I.
MP – mikropartikulum
MVB – mikrovezikuláris testek
MV – mikrovezikulum
PC – foszfatidil-kolin
PCT – procalcitonin
PE – phycoerythrin
PhE - foszfatidil-etanolamin
PFP – trombocita mentes plazma
PMP – trombocita eredetű mikropartikulum
PPP – trombocita szegény plazma
PS – foszfatidilszerin
PSGL-1 – P-selectin glikoprotein ligand-1
ROC – reciever operating curve
SM – szfingomilein
SC – side scatter (oldalirányú szórt fény)
TF – szöveti faktor
TGF β -1 – transforming growth factor β -1
TNF – tumor necrosis faktor
TRAP - trombin receptor aktiváló peptid

1. Bevezetés

1.1. Szubjektív előzmények és indíttatás

A mikropartikulumokkal (MP) először a PTE ÁOK Szívgyógyászati Klinikával (Dr. Komócsi András, Dr. Aradi Dániel) közös „DOSER” tanulmányunk kapcsán végzett irodalmazás során kerültem kapcsolatba [1,2]. Elektív perkután koronária intervención átesett betegeknél vizsgáltuk a sztent trombózis és insztent resztenózis megelőzésére alkalmazott trombocita aggregáció gátló clopidogrel kezelés során kialakuló rezisztencia hátterében álló okokat pl. a gyógyszer metabolizmusáért felelős CYP450 enzimrendszer különböző alocsaládjainak polimorfizmusait; az MDR-1 fehérjét kódoló gén C3435T, G2677T/A polimorfizmusait. Ez a fehérje végzi a xenobiotikumok jó részének sejtből történő eliminálását, melynek a clopidogrel is szubsztrátja. Vizsgáltuk a clopidogrel kezelés hatékonyságát, hagyományos optikai aggregometriával, P2Y12 receptor funkcionális teszttel (VASP fehérje foszforiláltsága áramlási citometriával) és a trombociták felszínén a CD41a, CD62P aktivációs markereket [3,4]. Ekkor beszélgettünk először arról dr. Magyarlaci Tamás kollégámmal - későbbi társtémavezetőmmel - aki sajnos ennek a dolgozatnak a megírását már nem élhette meg, hogy megpróbálhatnák az irodalomban fellelhető adatok alapján mi is bevezetni az Intézetben lévő áramlási citométerünkön a MP-ok mérését. 2007-ben Dr. Mühl Diána a PTE ÁOK Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetéből néhány érdekes elektronmikroszkópos képpel keresett meg bennünket. A preparátumok szeptikus betegek trombocita szuszpenzióiból készültek. A kérdés az volt, hogy a képeken látható „furcsa” trombociták mik is valójában? Akkori irodalmi ismereteink alapján mi az aktivált trombociták mellett, MP-kat véltünk felfedezni ezekben a preparátumokban... (1. Ábra) A következő megbeszélésünkön, pedig útjára indítottuk a MP-ok mérésének beállítását és mérését súlyos szeptikus betegcsoportban.



1.Ábra. Szeptikus beteg trombocita szuszpenziójának elektronmikroszkópos felvételei (Dr. Seress László, Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium)

1.2. Mikropartikulumok - rövid történeti áttekintés

A mikropartikulumokat először Chargaff írta le 1946-ban, precipitábilis faktorként mely a trombocitamentes plazmában gyorsítja a trombin képződést. „...az intakt trombocitáktól mentes plazma rekalifikáció után képes trombint generálni. A trombin képződés mértéke csökkenthető a plazma előzetes nagy sebességgel történő centrifugálásával,.. [5].

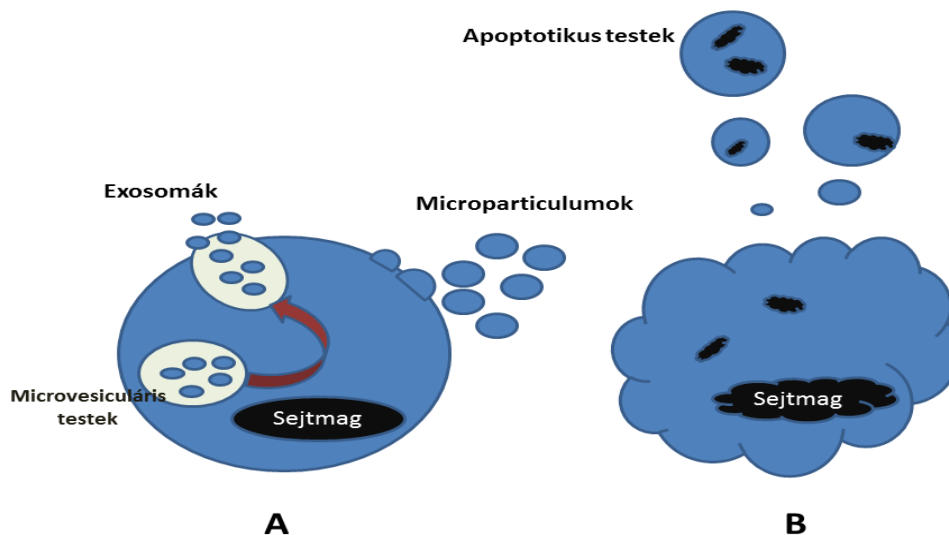
20 évvel később Wolf „trombocita pornak,, (platelet dust) nevezi el, mely a plazma ultracentrifugálása után képes trombin képzésre. Lineáris összefüggést írt le a vérmintában jelen lévő trombociták és a trombocita por mennyisége között. „...előfordul a normál plazmában, szérumban és frakcióiban, abból származó alvadási anyag apró részecske formában, mely a trombocitákból ered, de megkülönböztethető az intakt trombocitáktól és ülepíthető nagy sebességű centrifugálással., [6].

A 90-es évektől a mérési módszerek fejlődésének köszönhetően tudásunk a „trombocita-porról,, kiszélesedett. Ezeket a részecskéket mikropartikulumoknak (MP) illetve mikrovezikulumoknak (MV) nevezték el [7]. 1994-ben Satta és mtsai a monociták lipopoliszaharid (LPS) stimulusa után prokoaguláns aktivitással rendelkező

MP-at mutattak ki [8]. Combs és mtsai 1999-ben HUVEC sejteket stimuláltak TNF-al (Tumor necrosis factor) és vizsgálták a keletkező MP-ok morfológiai, immunológiai és funkcionális tulajdonságait [9]. A későbbiekben kiderült, hogy in vivo a trombocitán kívül más sejtekből is eredhetnek és nemcsak a keringésben, hanem más testfolyadékokban így a vizeletben, gerincvelői- és ízületi folyadékban, valamint a nyálban is kimutathatók [10,11,12,13].

1.3. A mikrovezikulumok típusai

Az eddigi irodalmi adatok alapján a keringésben kimutatható MV-ok lehetnek exosomák, MP-ok és apoptotikus részecskék. Ezek keletkezésüket és méretüket tekintve lényegesen eltérnek egymástól (2. Ábra).



2.Ábra. A vezikulumok keletkezésének sémás ábrázolása. Az exosomák létrejötte a mikrovezikuláris testek tartalmának kiválasztásával a sejt belsejéből. A MP-ok lefűződése a sejtmembránról (A). Az apoptotikus testek keletkezése a sejtmag DNS töredezése után (B). (Saját ábra)

A mikrovezikulumok morfológiai szempontból is lényeges különbséget mutatnak (1. Táblázat).

1.Táblázat: A mikrovezikulumok legfontosabb tulajdonságai.

Tulajdonság	Exosomák	Mikropartikulumok	Apoptotikus testek
Méret	0,03-0,1 µm	0,1- 1,0 µm	4,0 µm-ig
Centrifugális erő	100.000 g	~20.000 g	~16.000 g
Eredet	Multivezikuláris testekből, a sejt belsejéből	Sejtmembrán	Sejt fragmentumok
Összetétel	Koleszterin, szfingomielin, ceramid, alacsony foszfatidilszerin expozíció	Foszfatidilszerin expozíció	Foszfatidilszerin expozíció
Felszabadulás	Konstitutív és/vagy sejt aktiváció után	Sejt aktiváció, magas nyírófeszültség, apoptózis korai fázisa	Az apoptózis késői fázisa
Annexin V kötő kapacitás	Nem/Alacsony	Magas kötő kapacitás	Magas kötő kapacitás
Markerek	Tetraspanin fehérjék (CD63, CD9)	Integrinek, szelektinek és más az „anya” sejtre jellemző fehérjék	DNS fragmentumok, hisztonok

1.3.1. Az exosomák

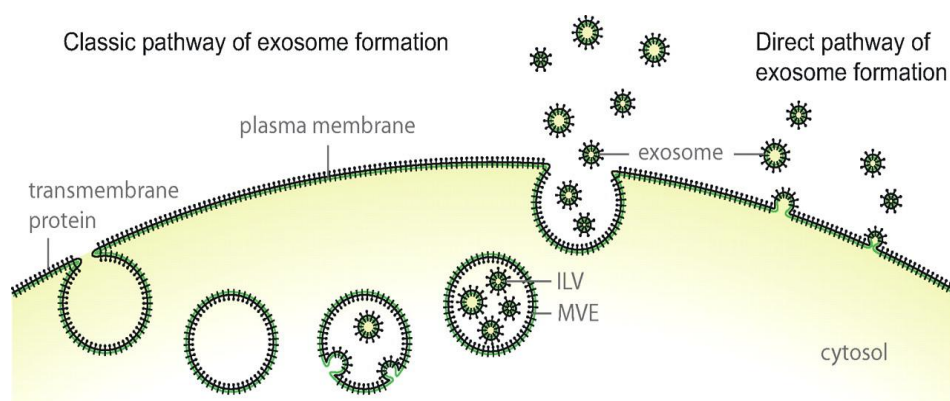
Az exosomák 30-100 nm nagyságú lipid kettős réteggel körülhatárolt vezikulumok melyek a sejt belsejében jönnek létre. Kialakulásukat a **3. Ábra** mutatja be. Az eukarióta sejtek az exocitózis segítségével választanak ki újonnan szintetizált fehérjéket és szénhidrátokat az extracelluláris térbe. Az exocitózis folyamatának szabályozó és jelátviteli szerepe van. A felszabadítás mechanizmusát tekintve létrejöhet konstitutív (nem Ca^{2+} által beindított) és szabályozott (Ca^{2+} által beindított) módon. A konstitutív exocitózis minden sejtben előfordul és szerepe van az extracelluláris mátrix komponensek kiválasztásában, ill. a transzport vezikulákba való beolvadás után az újonnan szintetizált fehérjék plazma membránba való beépülésében. A szabályozott exocitózisnak elsősorban a neurológiai jelátvitelben van szerepe [14].

Az exocitózis másik lehetséges formája a mikrovezikuláris testek (MVB) tartalmának kiszabadulása a sejtmembránnal való fuzionálásuk után. A MVB endocitózis után jönnek létre, vagyis, az endosomális rendszer egyik kiválasztási mechanizmusát képezik. Először retikulocitákban mutatták ki, ahol membrán fehérjék eltávolításában van szerepe a sejt vörösvértestté való érése során [15,16]. A retikulocitákban akár csak a többi emlős sejt esetében a sejtmembrán egy része rendszeresen internalizálódik

endosomák formájában, óránként akár 50-180%-a is [17]. Az endosomák membránjának egy része azután kisebb vezikulumok formájában internalizálódik, létrehozva a MVB-et.

A mikrovezikuláris testek lizozómákkal való egybeolvadásának eredményeként a bennük található fehérjék és lipidek proteolitikus emésztés után lebomlanak, ezáltal transzmembrán fehérjéket és főleg sejtmembránt távolítanak el a sejt felszínéről [18,19]. Az exosomák lumenükben és felszínükön elsősorban citoplazma eredetű fehérjéket tartalmaznak: pl. citoplazma fehérjéket (tubulin, aktin, annexinek), jelátviteli fehérjéket (protein kinázok, G-proteinek), MHC-I molekulákat, hő-sokk fehérjéket (Hsp 70, Hsp 90) [20,21,22]. Az exosomákhoz kapcsolt leggyakoribb fehérjék a tetraspaninok (CD9, CD63, CD81, CD82) [23]. Ezen kívül tartalmazhatnak még mikro-RNS-eket és foszfolipideket pl. foszfatidilszerint (PS), azonban ennek mennyisége az exosomák felszínén kevesebb, mint a MP-ok esetében [24].

Az exosomák megtalálhatók a különböző testfolyadékokban, így a vérben, vizeletben, nyálban, szinoviális folyadékban, anyatejben és a tumoros betegek ascitesében is [25,26,27]. A legtöbb sejt képes exosoma kiválasztásra konstitutív, vagy szabályozott módon a MVB-en keresztül. Biológiai hatásukat többféleképpen is kifejthetik: 1. direkt kapcsolódással a sejt felszínén lévő molekulákhoz 2. vezikulák endocitózisa 3. a vezikulum és a sejt membránjának egybeolvadása révén [28,29]. Ez a mechanizmus legjobban jellemzett az immunsejtek (T-, B-, dendritikus sejt, makrofág) esetében [22].



van der Pol E, N. Böing A, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. *Pharmacol Rew*, 2012; 64:676-705.

3. Ábra. Az exosomák kialakulása. A sejt két úton képes az exosomák kiválasztására. A klasszikus út (bal oldali): az intraluminális vezikulum képződése után a MVE membránja beolvad a sejt plazma membránba, melynek eredményeként az intraluminális vezikulumok felszabadulnak. Szekréció után ezeket nevezzük exosomáknak. A direkt út (jobb oldal) során a felszabaduló vezikulumok az exosomáktól nem elkülöníthetően direkt válnak le a plazma membránról.

1.3.2. Apoptotikus testek

A sejtek az apoptózis során, felszínükön PS-t hordozó vezikulumokat szabadítanak fel, amit apoptotikus testeknek (AB) vagy vezikulumoknak neveznek. Más sejt eredetű vezikulumokkal szemben a legnagyobb különbség méretükben rejlik, ami 1-5 μ m között van. Gyakran tartalmaznak DNS fragmentumokat [20,30,31]. Ez megfelel a keringésben jelen lévő trombociták méretének. Mivel az aktivált és az apoptozishoz hasonló folyamaton átmenő trombociták szintén hordoznak PS-t, megkülönböztetésük az AB-től ezen, tulajdonságaik alapján lehetetlen. Morfológiailag heterogénebbek, mint más sejteredetű vezikulumok. Az apoptotikus sejtek immunológiai szempontból kétféle AB-t szabadítanak fel: 1. a sejtmembránból eredők DNS-t és hisztonokat; 2. az endoplazmás retikulumból származók, melyek DNS-t és hisztonokat nem tartalmaznak, viszont éretlen cukor-epitópokat hordoznak [32].

Az apoptózis proteolitikus enzimek – kaspázok - közreműködésével megy végbe, melyek specifikus fehérjéket hasítanak a magban és a citoplazmában, ezáltal indítva el a sejthalált. Az apoptózis aktiválása végbemehet extrinszik (receptor-mediálta) és intrinszik (mitokondrium-mediálta) úton, ami végül a prokaspázok aktiválásához vezet (kaspáz-8, kaspáz-3) [33]. A kaspáz-3 kulcs-szerepét ebben a folyamatban az a megfigyelés is bizonyítja, hogy a kaspáz-3 deficiens MCF7 (humán mellrák) sejtvonalban membrán lefűződés nem tud létrejönni [34]. Morfológiailag az apoptózis során a sejtek zsugorodnak, a citoszkeleton összeomlik és a sejtmag DNS töredezik, majd a sejt szétesik. A keletkező apoptotikus testeket a szomszédos sejtek és a makrofágok gyorsan felismerik és bekebelezik [35]. Az apoptotikus vezikulumok nem megfelelő eltávolítása a keringésből szisztémás autoimmun betegségek kialakulásához vezethet [32].

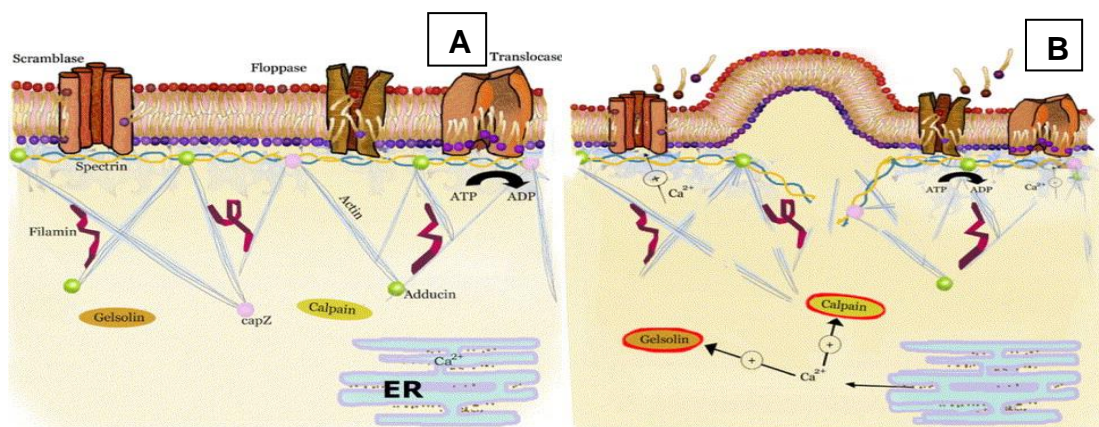
1.3.3. A mikropartikulumok

A mikropartikulumok 0,1-1,0 μ m nagyságú, sejteredetű vezikuláris strukturák, melyek tartalmaznak membrán szkeletont, de hiányzik belőlük a mag és nem rendelkeznek szintetikus kapacitással. Felszínükön sejteredetű és a mintaelőkészítés/leválás függvényében különböző mennyiségben expresszálhatnak PS-t (International Society on Thrombosis and Haemostasis; Scientific and Standardization Committee Meeting;

Sydney, 2005). Újabb irodalmi adatok szerint viszont léteznek olyan MP-ok, melyek felszínükön nem expresszálnak PS-t [36,37]. A MP-ok az extracelluláris mikro környezetbe sejtaktiváció, magas nyírófeszültség hatására, valamint az apoptózis korai szakaszában válnak le a sejtmembránról fiziológias és patológias körülmények között. Kialakulásuk tehát aktív folyamat eredménye [29]. Sejteredetük kimutatható, mivel az „anyasejt” felszínén található fehérjékből magukkal vihetnek, így származhatnak a keringésben található trombocitákból, neutrofilekből, monocitákból, limfocitákból és vörösvértestekből, valamint az endotél sejtekből [38]. A MP-ok belsejükben hordozhatnak citoplazma és mag (pl. mitokondrium, enzimek, transzkripciós faktorok, mRNS és DNS) komponenseket [39,40,41]. A keringésen kívül megtalálhatók a testfolyadékokban: vizelet, szinoviális folyadék, liquor, könny, nyál, anyatej és broncho-alveoláris mosófolyadék [42,43,44,45].

1.3.3.1. A mikropartikulumok kialakulása

A lipid kettős rétegű sejtmembrán foszfolipid összetétele és eloszlása specifikus: a foszfatidil-kolin (PC) és a szfingomilein (SM) a membrán külső rétegében, míg a foszfatidil-serin (PS) és foszfatidil-etanolamin (PhE) a belső rétegében található. Ez a membrán asszimmetria a sejt szempontjából elengedhetetlen és ezt komplex transzmembrán enzimatis égyensúly fenntartása révén éri el. Sejtaktiváció, apoptózis és nekrozis során a membrán elveszti foszfolipid asszimetriáját, aminek eredményeként a membrán külső rétegében PS jelenik meg [46]. A membrán foszfolipid asszimmetria szabályozását és fenntartását három különböző enzim típus végzi: flippáz, floppáz és a szkrambláz [47]. A flippáz vagy más néven transzlokáz a sejtmembrán külső rétegéből adenzin-5'-trifoszfát (ATP) felhasználásával PS-t és PhE-t szállít a membrán belső rétegébe. Egy molekula PS vagy PhE szállításához egy molekula ATP-t használ fel, vagyis energia igényes, koncentráció gradiens ellenében történő folyamat. A floppáz szintén ATP dependens fehérje, mely ellenkező irányba helyezi át a PC-t és a SM-t, fenntartva ez által a membrán asszimetriát. A szkrambláz nem specifikus, nem ATP függő és mindkét irányba szállítja a foszfolipideket (**4. Ábra-A**).



Piccin A, Murphy W G, Smith O P. Blood Rev. 2007;21(3):157-171.

4. Ábra. A mikropartikulumok kialakulása. Nyugvó citoskeleton (A) és a citoskeleton átrendeződése sejtaktiváció után (B).

A sejt aktiválása során az endoplazmatikus retikulumban tárolt Ca^{2+} felszabadul, intracelluláris mennyisége nő, ami a flippáz inaktiválásához és a floppáz valamint a szkrambláz aktiválásához vezet. Ezek eredményeként a membrán külső rétegében PS molekulák jelennek meg és a membrán asszimmetria eltűnik. A calpain és a gelsolin Ca^{2+} dependens módon szintén aktiválódik. A calpain hasítja a hosszú aktin filamentumokat, a gelsolin pedig az aktint „fedő”, fehérjét, ennek eredményeként a fehérjék citoskeletonhoz való horgonyzása megszakad lehetővé téve a membrán kiboltosulását és a MP-ok leválását a sejtmembránról (**4. Ábra-B**). Fontos megjegyezni, hogy a PS megjelenése a külső membrán rétegben általános tulajdonsága az aktivált ill. apoptózisba átment sejteknek, melynek eredményeként MP-at képesek felszabadítani [38,48]. A trombociták esetében a foszfolipid membrán átrendeződés és a PS expozíció jellemzi a fiziológias prokoaguláns választ. A MP-ok és a felszínén jelen lévő PS további felszín képez a protrombináz és a tenáz véralvadási enzim komplexek összeszereléséhez, ami trombin generáláshoz és a véralvadás folyamatának beindításához vezet [48]. Érdekes módon a trombocita eredetű MP-ok felszíne 50-100-szor nagyobb prokoaguláns aktivitással rendelkeznek, mint a normál trombocita felszín [49]. A membrán átrendeződés és MP képződés fontosságát mutatja a hemosztázis területén a Scott szindrómás betegek példája. Ebben a ritka örökletes, haemorrhágiás betegségben szenvedő egyének (jelenleg 3 ilyen esetet tartanak nyilván) floppáz működése zavart szenved, aminek eredményeként nem tudják a PS-t externalizálni, csökken vagy eltűnik a MP képződés, eredménye pedig a közepes vagy súlyos

vérzékenység. A Scott szindrómához hasonlóan az örökletes Castaman szindrómában is a MP képződés zavara áll fenn, azzal a különbséggel, hogy ezeknél a betegeknél a protrombináz képződés (aktivitás) nem szenved zavart. A Stormorken szindróma szintén vérzékenységgel jár együtt annak ellenére, hogy a trombociták felszínén megnő a PS expozíció és fokozott a MP képződés. Hátterében az STIM1 (Stromal interaction molecule 1) gain of function mutációja áll, aminek eredményeként a trombocitákban a nyugalmi intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedik, agonistákra adott válaszként túlzott a Ca^{2+} beáramlás [50,51,52,102].

1.3.3.2. A mikropartikulumok membránfehérjéi

A mikropartikulumok kialakulásuk során az „anyasejtre” jellemző membránfehérjéket visznek magukkal, melyek lehetnek bioaktív anyagok, a membránhoz lehorgonyzott receptorok és adhéziós molekulák. Ezek segítségével képesek kölcsönhatásba lépni pl. kitapadni és beolvadni más célsejtekhez lehetővé téve a sejtek közötti kommunikációt, biológiailag aktív anyagok átvitelét. Méréstechnikai szempontból is fontos szerepet töltenek be, mivel jelölt antitestek segítségével a MP-ok kimutathatóvá válnak, sejteredetük megállapítható. A **2. Táblázat** a MP-ok azonosítására leggyakrabban használt CD markereket mutatja be.

2. Táblázat: A MP-ok sejteredetének kimutatására leggyakrabban használt CD markerek.

Sejteredet	Marker	Funkció
Trombocita	CD61 GPIIb/IIIa	- Integrin β 3-lánc - CD51-el (vitronectin receptor) - aktiváció nélküli sejtadhézió (vWF, fibrinogén, vitronectin, trombospondin)
	CD41 GPIIb/IIIa	- Integrin α IIb-lánc, sejtadhézió
	CD42a GPIb/V/IX	- GPIX – vWF és nagy affinitású trombin kötőhely
	PAC1 GPIIb/IIIa	- csak az aktivált trombocitán, specifikus felismerő hely a fibrinogén bekötő hely mellett
Endotél sejt	CD31 PECAM-1	- trombocita - endotél sejtadhéziós molekula GPIIa-val – trombocita, monocita, granulocita, B, T sejt – endoteliális adhéziós molekula
	CD62E E szelektin, ELAM-1	- endotél-leukocita adhéziós molekula aktivált endotél sejten, elsősorban gyulladást követően
Leukocita	CD45	- pán leukocita marker
	CD13 aminopeptidase N	- granulocita, monocita marker
	CD14 LPS-receptor	- lipopoliszaharid receptor, monocita/makrofág, kis mennyiségben neutrofil sejteken
Eritrocita	CD235a	- glycophorin A (Gly A)
Limfocita	CD4	-T sejt aktivációs és HIV receptor, T helper limfocitákon, monocitákon, makrofágokon és dentritikus sejteken
	CD8	- TCR ko-receptor, T szupresszor és T citotoxikus limfocitákon
	CD56 NCAM	- sejt-sejt adhézióban van szerepe, NK sejt marker

Rövidítések: PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule; ELAM-1: endothelial-leucocyte adhesion molecule; LPS: lipopoliszaharid; NCAM: neural cell adhesion molecule.

A keringésben kimutatható MP-ok sejteredetüket tekintve legnagyobb mennyiségben a trombocitákból származnak. Ez körülbelül a keringésben lévő mikropartikulumok 70-90%-át teszi ki. Lényegesen kevesebb a vörösvértestekből (5-10%), a leukocitákból, monocitákból és endotél sejtekből (<5%) eredő MP-ok száma. A limfocitákból (T sejt, B sejt) eredőek pedig szinte elhanyagolható <1%-ban vannak jelen.

1.3.3.3. A mikropartikulumok életideje a keringésben

A keringésben található MP-ok mennyisége függ a keletkezésük és clearance-ük közötti egyensúlytól. Eddig több lehetséges mechanizmust is leírtak a keringésből való eltávolításukra. Közülük a legfontosabb a foszfolipázok és proteázok által történő lebontás [53]. További lehetőségek: opszonizáció utáni fagocitózis, PS-dependens felvétel a máj Kupffer sejtjei által, lépsejtek általi fagocitózis és a tüdő makrofág sejtjei

által való felvétel [54,55,56]. A trombociták életideje a keringésben kb. 10 nap. Ezzel szemben a trombocita eredetű mikropartikulumoké egérben 30 perc körüli, míg nyulakban kevesebb, mint 10 perc [57,58]. Patkány modellben a vörösvértest eredetű MP-ok életideje 60 perc és eltávolításukban a lép és a máj vesz részt [59]. Humán vérben trombocita koncentrátum beadása után a PS pozitív MP-ok fél-életideje hosszabb kb. 5,8 óra, míg a CD61⁺ trombocita eredetű mikropartikulumoké (PMP) 5,3 óra [60].

1.3.3.4. A mikropartikulumok szerepe

A keringésben található MP-ok többféle mechanizmussal jöhetnek létre és eredetük tekintetében származhatnak több sejttípusból is pl. trombociták, endotél sejtek, eritrociták, mononukleáris sejtek. Ennek megfelelően mind fiziológiás, mind patofiziológiás szempontból sok fajta szerepet betölthetnek. A **3. Táblázat** a keringésben található különböző sejteredetű MP-ok százalékos összetételét mutatja be.

3. Táblázat: A MP-ok százalékos összetétele a keringésben.

A MP sejteredete	Marker	A plazmában található %-os összetétel
Trombocita	CD61 CD63 CD62P CD41	70-90%
Leukocita	CD45	<5%
Vörösvértest	Glycophorin A	5-10%
T helper	CD4	<1%
T citotoxicus	CD8	<1%
B sejt	CD20	<1%
Monocita	CD14	<5%
Endotél sejt	CD62E	<5%

1.3.3.4.a. A mikropartikulumok hemosztázisban betöltött szerepe

A trombocita eredetű MP-ok (PMP) kifejezett prokoaguláns aktivitással rendelkeznek, ez felületegységre vonatkoztatva 50-100-szor nagyobb, mint az aktivált trombociták esetében [49]. A PMP-k felszínén nagy mennyiségben megtalálható az anionos PS, valamint a véralvadási kaszkád beindításához szükséges fehérje, a szöveti faktor (TF). A TF két formában található meg a MP-on: egyrészt látens („encrypted”) prokoaguláns aktivitással nem rendelkező, másrészt aktív („de-encrypted”) a koagulációs kaszkád

inicializálására képes formában. A TF aktívvá válásához szükséges egy diszulfid kötés hasítása és a fehérje konformáció változása, melynek eredményeként képessé válik a VIIa faktorról való komplex képzésre. A komplex pedig kötődik és aktiválja a X faktort [61]. A TF hordozó MP-ok trombociták felszínéhez való kötődéséhez szükség van egy „dokkoló”, fehérjére. Az aktivált trombociták felszínükön P-szelektint expresszálnak. Ez a P-szelektin glicoprotein ligand-1 (PSGL-1) receptoron keresztül képes a MP-ok trombocita felszínéhez való dokkolására. Az eredmény a MP-ok és az aktivált trombociták fúziója, melyhez mindkét membrán felszínén szükség van a PS expresszióra és Annexin V-el gátolható [62,63,64]. Az anionos töltésű PS és az alvadási faktorokon (II, VII, IX, X) található pozitív töltésű γ -karboxi-glutaminsav domain közötti elektrosztatikus kölcsönhatás eredményeként lehetővé válik a véralvadási kaszkád beindításához szükséges komplexek összeszerelődése. A véralvadási folyamat során aktiválódott trombociták további PS pozitív mikropartikulumokat hoznak létre [65]. Irodalmi adatok szerint bizonyos MP-ok antikoaguláns fehérjéket is hordozhatnak a felszínükön pl. TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), Protein C, Protein S, trombomodulin [66,67].

1.3.3.4.b. A mikropartikulumok és a gyulladás

Az akut gyulladáshoz vezető folyamatok viszonylag gyors (néhány napos) lefolyásúak, melyet elsősorban a vazóaktív aminok pl. hisztamin, szerotonin, bradikinin és a komplementrendszer alkotó elemeinek felszabadulása vált ki válaszként a szervezetet ért behatásra. A kiváltó ok (antigén) fennmaradása esetén a gyógyulás nem tud végbemenni és a folyamat átmehet krónikus gyulladásba, melynek lefolyása elhúzódó, akár évekig is eltarthat, általában maradandó szövetkárosodás kíséri. Mediátorai citokinek, reaktív oxigén gyökök, növekedési faktorok és hidrolitikus enzimek. A MP-ok számos immunológiailag aktív molekulát szállíthatnak, melyek a gyulladás mediátorainak tekinthetők és proinflammatorikus tulajdonsággal bírnak. In vitro kísérletek alapján a komplement kaszkád aktiválásával elindíthatják a gyulladás folyamatát valamint a leukociták kitapadását, gördülését és további MP-ok leválását különböző sejtekből. A trombocita eredetű MP-ok fokozhatják a már kitapadt neutrofil sejtekhez további neutrofilek kapcsolódását. Ez a MP-ok felszínén lévő P-szelektin közvetítésével jön létre, mely képes a neutrofilek felszínén lévő PSGL-1-hez

kapcsolódni [68,69]. Képesek arachidonsav szállítására és átadására, mely növeli a monociták endotél sejtekhez való kitapadását [70]. Az arachidonsav transzfer az endotél sejtekben és a monocitákban COX-2 expressziót vált ki, mely fokozza a prosztaglandinok termelését [71,72]. Bizonyos ingerek hatására a MP-ban citokinek halmozódhatnak fel, ahogy az az IL-1 β (interleukin-1 β) esetében bizonyítást nyert [73]. A MP-ok gyulladásgátló tulajdonságokkal is rendelkeznek. A Fas ligandot hordozó MP-ok immunkompetens B és T sejtek apoptózisát indíthatják el [74,75]. Az fMLP-vel (formil-metionin-leucin-fenilalanin) stimulált polimorfonukleáris sejtekből származó MP-ok fokozták a TGF β -1 (transforming growth factor- β 1) expresszióját makrofágokban, mely egy gyulladásgátló citokin [76]. A MP-ok proinflammatorikus tulajdonságát támogató in vivo bizonyítékok elsősorban a gyulladással járó folyamatokban mért emelkedett különböző sejteredetű MP számra korlátozódnak. (l. következő fejezet)

1.3.3.4.c. Mikropartikulumok és a betegségek

4. Táblázat: A különböző sejteredetű mikropartikulumok előfordulása és mennyiségi változása különböző betegségcsoportokban.

Klinikai állapot	MP-k sejteredete	MP-ok szintje a keringésben	Hivatkozás
Kardiovaszkuláris megbetegedés			
Diszlipidémia	Trombocita Endotél	Emelkedett	Boulanger et al 77 Nomura et al 78
Ateroszklerózis	Trombocita Endotél Monocita	Emelkedett	van der Zee et al 79 Bernal-Mizrachi et al 80 Koga et al 81 Werner et al. 82 Leyorer et al 83 Nomura at al 84
Magas vérnyomás	Trombocita Endotél	Emelkedett	Preston et al 85
Diabétesz mellitusz	Trombocita Endotél Monocita	Emelkedett	Feng et al 86 Ogata et al 87,88 Nomura et al 89,90 Tan et al 91 Omoto et al 92
Akut koronária szindróma	Trombocita Endotél	Emelkedett	Huisse et al 93 Matsumoto et al 94 Mallat et al 95 Bernal-Mizrachi et al 80,96 Heloire et al 97 Biasucci et al 98
Vérzéses és trombotikus elváltozások			
Scott szindróma	Trombocita Vörösvértest	Csökkent	Sims et al 99 Bever et al 100 Toti et al 50
Castaman szindróma	Trombocita	Csökkent	Castaman et al 52,101
Stormorken szindróma	Trombocita	Emelkedett	Stormorken et al 102
Mélyvénás trombózis és pulmonális embólia	Trombocita Endotél	Emelkedett	Wakefield et al 103 Chirinos et al 104 Rectenwald et al 105 Buciarelli et al 106
Heparin indukálta trombocitopénia	Trombocita	Emelkedett	Hughes et al 107 Warkentin et al 108
Antifoszfolipid szindróma	Trombocita Endotél	Emelkedett	Dignat-George et al 109 Jy et al 110
Trombotikus trombocitopéniás purpura	Trombocita Endotél	Emelkedett	Jimenez et al 111,112
Paroxizmális nokturnális hemoglobinuria	Vörösvértest Trombocita	Emelkedett	Hugel et al 113 Wiedmer et al 114 Kozuma et al 115
Sarlósejtes anémia	Vörösvértest Trombocita Endotél Monocita	Emelkedett	Wun et al 116 Shet et al 117 van Beers et al 118
Thalassaemiák	Vörösvértest Trombocita	Emelkedett	Pattanapanyasat et al 55 Habib et al 119
Fertőző betegségek			
Szepszis	Trombocita Monocita Endotél Neutrofil	Emelkedett	Nieuwland et al 120 Joop et al 121 Soriano et al 122 Fujimi et al 123 Ogura et al 124 Mostefai et al 125
HIV fertőzés	Limfocita Trombocita Monocita	Emelkedett	Rozmyslowicz et al 126 Correlas Medina et al 127
Prion betegség	Trombocita	Emelkedett	Robertson et al 128
Más betegségek			
Daganatos betegségek	Trombocita Monocita Tumor Endotél	Emelkedett	Toth et al 129 Tilley et al 130 Manley et al 131 Campbello et al 132
Reumatoid arthritis	Trombocita Limfocita	Emelkedett	Knijff-Dutmer et al 133 Berkmans et al 134 Umekita et al 135

Barteneva et al. BMC Cell Biology 2013,14:23 alapján

1.3.3.5. A mikropartikulumok kimutatására használt módszerek

Kezdetben a mikropartikulumok kimutatására az ELISA, a szilárd fázishoz kötött (solide phase capture) technikák, az elektron mikroszkópia, valamint, az áramlási citometria állt rendelkezésre [136]. Az első két módszer előnye, hogy a mintákban jelen lévő MP-ok legnagyobb részét detektálni tudja még a legkisebb mérettartományban is, viszont számukat indirekt módon adja meg, csak a felszínhez kötött markerre pozitív részecskéket képes analizálni, aktuális számolásukra nem alkalmas. Elektron mikroszkóppal a MP-ok morfológiailag jól jellemezhetőek viszont, számuk meghatározására nem alkalmas, időigényes és költséges. Az áramlási citometria a fényszórás és a fluoreszcens festés kombinálásával alkalmas a különböző sejteredetű MP-ok számolására, több markerrel való egyidejű jellemzésére, akár funkcionális tesztek elvégzésére is. Hátránya a FS (forward scatter – átmenő fényszórás) méret korlátja, ami a lézerfény hullámhosszából adódik (488 nm), emiatt a kisméretű (<0,3; 0,5 μm) részecskéket nem tudja megfelelően elválasztani a háttérzajtól.

Mivel a MP-ok jellemzése, élettani és kórélettani szerepének tisztázása egyre nagyobb érdeklődésre tart számot, ezen a területen is új mérési módszerek kerültek bevezetésre.

Impedancián alapuló **áramlási citometria** (Impedance based flow cytometry) a Coulter elvet használja fel a MP szám és méret meghatározására. Érzékenységet a MP méretéhez viszonyítva a csatorna mérete határozza meg. Alsó detektálási határa 300 nm. Hátránya, hogy nem ad felvilágosítást a MP-ok sejteredetéről, morfológiájáról és biokémiai összetételéről [137,138].

AFM (atomic force microscopy) atomi erő mikroszkópia a szubmikron (<1 nm) méretű részecskék detektálására kidolgozott magas felbontású pásztázó mikroszkópia. Az AFM egy tartókar és ultra vékony hegyű-tű segítségével képes a minta felületét fizikai kontaktus nélkül pásztázni. A hegyben kifejtett erő változik a felszín magasságbeli különbségével, mely a tartókar elhajlását eredményezi. A tartókart lézerfényrel világítják meg, mely az elhajlás alapján megadja az aktuális pozíciót és a képképző software segítségével a felszín 3 dimenziós képét. A függőleges felbontása <1,0 nm, oldalsó felbontása pedig 3,0 nm. Jól használható a MP-ok fiziológiás állapotban való relatív méreteloszlásának vizsgálatára <5 μm mérettartományban is. Ha a felszínt a minta hozzáadása előtt különböző antitestekkel vonják be a módszer fenotipizálásra is alkalmas. Mivel a MP-ok antitesttel bevont felszínhez való kötődésének hatékonysága

ismeretlen, a MP koncentráció pontos meghatározása bizonytalan. Hátránya még, hogy időigényes és költséges [139,140].

TEM (transmission electron microscopy) mikroszkópia a képalkotáshoz fotonok helyett elektronokat használ. Mivel az elektronok hullámhossza három nagyságrenddel rövidebb, mint a látható fényé, a TEM felbontása <1 nm. Alkalmas a MP-ok méretének és morfológiájának meghatározására. Mivel azonban a mérés vákuumban zajlik szükséges a minták fixációja és dehidrációja, ami befolyásolhatja a fent említett két tulajdonságot. A mintaelőkészítéstől jelentősen függ a méreteloszlás, ezért koncentráció meghatározásra nem alkalmas. Immuno-gold jelöléssel biokémiai információk nyerhetők a MP-ról. Időigényes és költséges [141].

NTA (Nanoparticle tracking analysis) a részecskék abszolút méreteloszlását méri 50nm - 1 μ m tartományban. A folyadékban lévő részecskék lézerténnyel vannak megvilágítva, a fényszórást optikai mikroszkóppal detektálják. A fényszórás következtében a részecskék kis fényes pontokként láthatók, melyek a Brown mozgásnak megfelelően mozognak. Az egyedi részecskék mozgását néhány percen át videó sorozattal rögzítik, majd képértékelő software segítségével kiszámítják átlagos sebességüket. Ismert méretű és koncentrációjú gyöngyökkel történő kalibrálás után a MP mérete és koncentrációja meghatározható. Hátránya, hogy 50 nm alatti részecskék nem detektálhatók, a MP-ok sejteredetéről és biokémiai összetételéről nem ad felvilágosítást [142].

2. Célkitűzések

Laboratóriumi célok:

- A rendelkezésre álló irodalmi adatokból kiindulva stabil módszer kidolgozása a mikropartikulumok izolálására és Beckman-Coulter FC500 áramlási citométeren való mérésére
- Kontroll csoport kialakítása, a módszer tesztelése egészséges önkénteseken, referencia tartomány kialakítása céljából

Klinikai célok:

- A mikropartikulumok klinikai jelentőségének vizsgálata szeptikus betegekben
- A mikropartikulumok klinikai jelentőségének vizsgálata COPD-s betegekben, különös tekintettel a stabil és a betegség exacerbációjában szenvedő betegekre

3. Anyag és módszer

3.1. Mintakezelés

A mikropartikulum méréseket más laboratóriumi vizsgálatokhoz hasonlóan jelentősen befolyásolhatják a preanalitikai változók. Ide tartozik a helyes vérvétel, melyet az ajánlásoknak megfelelően a könyökhajlati vénából, 19-21G-s méretű tűvel, a véna minél kevesebb ideig történő leszorításával kell elvégezni. Az első 3,0 ml vért akárcsak a véralvadási vizsgálatok esetén nem használjuk fel a méréshez: a TF-al való szennyeződése, a lehetséges kontakt aktiváció és a szövetnedvvel történő felhígulása miatt. Fontos a megfelelő antikoaguláns kiválasztása. A MP mérésekhez leggyakrabban használt antikoaguláns a pufferolt Na_3 -citrát, mely Ca^{2+} kelátor, ezáltal *ex vivo* hozzáférhetetlenné teszi a Ca^{2+} -ot a véralvadási rendszer számára és megakadályozza a leukociták és a trombociták degranulációját [143]. A Ca^{2+} fontos szerepet játszik a membrán foszfolipidek átrendeződésében, a rendszerből való elvonása így megakadályozza a MP-ok képződését [144]. Az EDTA erős Ca^{2+} kelátor, ennek ellenére képes elindítani a trombociták P-szelektin függő aktiválását. A mintavételi csőben jelen lévő magas K koncentráció hatása a MP-ra jelenleg nem ismert. Ezért az EDTA-s mintavételi csövek használata a MP mérésekhez nem ajánlott. Az EDTA-hoz hasonlóan nem ajánlott a heparin alvadásgátlóként való használata sem. Egyrészt a trombociták aktivációjára és aggregációjára való hatása miatt, másrészt, mivel nem Ca^{2+} kelátor nem képes megakadályozni vérvétel után a trombocitákból való MP képződést. A heparinos mintából így szignifikánsan magasabb Annexin V pozitív MP mutatható ki, mint a citrátosból [145,146]. A CTAD (citrát-theophilin-adenosin-dipiridamol) alvadásgátló MP mérésekre való használatával kapcsolatos eddigi irodalmi adataink ellentmondásosak, a hirudinnal kapcsolatban pedig nincs elegendő adat [147].

A fenti irodalmi adatok figyelembevételével a mintavétel a kontroll és a beteganyag esetében könyökhajlati vénából, rövid leszorítás után 21G-s tűvel (Becton Dickinson) 2,7 ml-es 3,8% (0,129 M) Na_3 -citráttal alvadásgátló (Becton Dickinson) zárt vérvételi rendszerű mintavételi csövekbe történt. Az első 3 ml vér nem került felhasználásra. A minták azonnal szállításra kerültek és egy órán belül feldolgoztuk őket.

3.2. A mikropartikulumok izolálása

A MP-ok izolálására jelenleg nincs egységes módszer. Centrifugálási idők és erők tekintetében is számos módszer terjedt el. Egy részük csak trombocita szegény (PPP) és mentes plazma (PFP) elérésére törekszik, más részük ülepti is a MP-at (**5. Táblázat**). Ennek következtében az elemezni kívánt MP-ok mennyisége és összetétele sejteredet szempontjából is jelentősen változhat.

5. Táblázat: A mikropartikulumok izolálására használt módszerek.

Szerző	PPP+PFP	MP pellet izolálás
Bíró et al.	1550Xg, 20 min	18.000Xg, 30 min
Dignat-George et al.	1500Xg, 15 min 13.000Xg, 2 min	-
Freyssinet et al.	1500Xg, 15 min 13.000Xg, 2 min	-
Jimenez et al.	200Xg, 10 min 1500Xg, 7 min	-
Nomura	1500Xg, 20 min	-
Shet et al.	13.000Xg, 10 min	100.000Xg, 60 min
Sinauridze et al.	1500Xg, 15 min 10.000Xg, 10 min	100.000Xg, 60 min

J Thromb Haemost 2004;2:1842-3.

Rövidítések: PPP: platelet poor plasma (trombocita szegény plazma); PFP: platelet free plasma (trombocita mentes plazma); MP: mikropartikulum.

A trombocita szegény és mentes plazma még tartalmazhat trombocitákat, - melyekből az állás során további MP-ok keletkezhetnek - ill. sejtörmelék, melyet tévesen MP-ként azonosíthatunk. Ezen hibalehetőségek elkerülésére dolgoztunk ki módszert a MP-ok izolálására.

A MP-ok izolálásához az első centrifugálás 800Xg-vel 20 perc szobahőmérsékleten történik, melynek eredményeként trombocita dús plazmát nyerünk. 1,5 ml felülúszót egy másik centrifugacsőbe viszünk át és 1500Xg-vel 20 percig újra centrifugáljuk. Az így nyert trombocita szegény plazmából 1,0 ml szupernatánst új teszt csőbe viszünk át és további 20 percet centrifugáljuk 1500Xg-vel. A sejtmentes plazma felülúszójának 500 µl-ét Eppendorf csőbe visszük át és a MP-at 18.000Xg-vel üleptjük 10 percig. A szupernatánst óvatosan eltávolítjuk a pelletről úgy, hogy 25 µl plazmát az Eppendorf cső alján hagyunk. A MP-at 20 sec-ig történő vortexeléssel óvatosan reszuszpendáljuk, majd 1,0 ml CaCl₂-t nem tartalmazó Apo-binding pufferbe vesszük fel (10 mmol/l HEPES, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl₂, 136 mmol/l NaCl, pH=7,4. A HEPES Sigma-

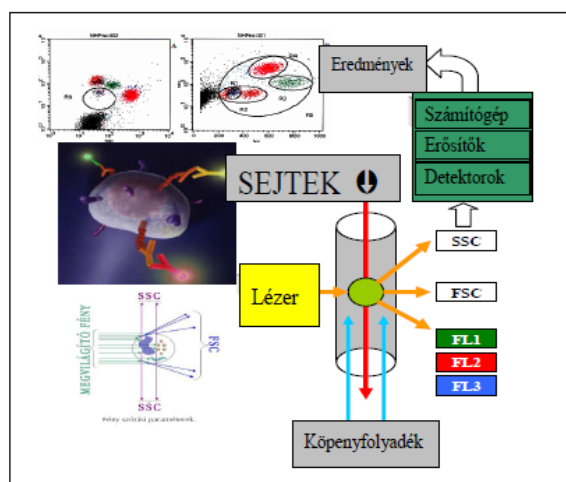
Aldrich KFT, Budapest, Magyarország, míg a többi analitikai tisztaságú reagenst a Reanal KFT, Budapest, Magyarország szereztük be).

3.3. A mikropartikulumok mérése

A MP-ok mérésére jelenleg nincs egységes és standardizált mérési módszer. A különböző mérési módszerekkel mért eredmények nehezen összehasonlíthatóak. A leginkább elterjedt mérési módszer az áramlási citometria. Nagy előnye, hogy a MP szám megadása mellett egyszerre képes jellemezni a különböző eredetű MP-kat.

Az áramlási citométer egyszerre képes mérni majd elemezni egyetlen részecske (általában sejt) többszörös fizikai tulajdonságát, ami egy folyadék áramban halad át egy fényforrás előtt. A mért jellemzők magukba foglalják a részecske relatív méretét, szemcsézettségét és belső komplexitását valamint relatív fluoreszcencia intenzitását. Az áramlási citométer 3 fő részből áll: fluidika vagy folyadék rendszer, optika és elektronika (**5. Ábra**).

- A folyadék rendszer biztosítja a részecskék egyenkénti áthaladását a lézer fényforrás előtt. Ezt egy köpenyfolyadék segítségével valósítja meg melynek áramlási sebessége nagyobb, mint a beinjektált mintáé, ez által fókuszálja azt (hidrodinamikai fókuszálás).
- Az optikai rész a lézer fényforrást (egy vagy több) foglalja magába, mely a minta áramban megvilágítja a részecskéket valamint az optikai filtereket, melyek a keletkező fényjeleket a megfelelő detektorhoz irányítják.
- Az elektronikai rendszer, pedig az érzékelt fényjeleket alakítja át elektronikus jellé, feldolgozhatóvá téve így a számítógép számára.



5. Ábra. Áramlási citométer felépítése.

A lézerefényforrás előtt áthaladó részecske a fényt minden irányban szórja. Ezt a szórt fényt a különböző irányban elhelyezett detektorok fogják fel. A fényforrással átellenben elhelyezett detektor az átmenő szórt fényt (forward-scatter /FS - átmenő szórt fény) fogja fel, ami arányos a részecske méretével. Ez a detektor általában az 1-70°-ban szóródó fényt érzékeli a készülék felépítésétől függően. Minél nagyobb ez a gyűjtő szög annál nagyobb a készülék FS érzékenysége. Az oldalirányú szórt fényt (side-scatter /SC – oldalirányú szórt fény) a lézerhez képest egy 90°-ban elhelyezett detektor érzékeli (gyűjtési szöge 47-133°), mely a részecske szemcsészettségéről és összetettségéről ad felvilágosítást. A legtöbb áramlási citométer 3 mérettartományban képes méréseket végezni: az 1-15 µm nagyságrendben, mely a vér sejtjes elemeinek felel meg, a 0,1-1,0 µm mikropartikulum és baktérium mérettartomány valamint a 20-50 (akár 100) µm nagyságrendű tumorsejtek és sejtvonalak. Az áramlási citométer a FS és SC jeleken kívül képes fluoreszcens jeleket is detektálni. Az emissziós jel a monoklonális antitesthez konjugált fluoreszcens molekuláról származik. A monoklonális antitest a részecske felszínén lévő CD (cluster of differentiation) molekulákat ismeri fel. A fluoreszcens molekulák a lézerefény hatására gerjesztődnek és magasabb energiaállapotba kerülnek. Az alapállapotba való visszatérésük során fényenergiát bocsájtanak ki magasabb hullámhosszú fény formájában. A fényjeleket a fluoreszcens csatornákon fényelektromos sokszorozó (photomultiplier) csövek detektálják, az elektronikai rendszer pedig átalakítja a számítógépes feldolgozáshoz. A kapott jelek ún. dot-plot-ok és histogram-ok formájában ábrázolódnak. A részecskék egyszerre több flouorforral való jelölése lehetővé teszi, hogy egyszerre több tulajdonságukat is vizsgáljuk. A kereskedelemben jelenleg több fajta áramlási citométer van forgalomban különböző érzékenységgel és jellemzőkkel a MP mérés tekintetében. A legtöbb forgalomban lévő citométer FS méret detektálási küszöbe 0,5 µm körül van a lézerefényforrás hullámhossza miatt (488 nm), ezért a fenti méret alatt a régi típusú áramlási citométerek már nem tudnak különbséget tenni a részecskék között. Következésképpen a MP populációk csak egy részét tudják detektálni (MP mérettartomány 0,1-1,0 µm között). Az újonnan forgalomba került Beckman Coulter GalliosTM és Apogee A50 nagyobb FS gyűjtőszöge lehetővé teszi a MP részecskék kisebb mérettartományban való pontos elkülönítését is [148,149,150,151,153].

Intézetünkben a MP mérések beállítását egy Beckman Coulter FC500 készüléken végeztük. Két lézertényforrással rendelkezik: kék argon-ion lézer (488 nm) és egy opcionális vörös szilárdtest lézer (633 nm). A fluoreszcens jeleket 5 fluoreszcens csatornán detektálja: FL1=521nm/40, FL2=575nm/40, FL3=620nm/20, FL4=675nm/40, FL5=755nm/40. Az FS detektor gyűjtő szöge 2-16°, ami nem teszi lehetővé a 0,4 µm alatti részecskék pontos elkülönítését a fény és elektromos háttérzajtól.

Munkánk elkezdésekor a MP-ok áramlási citometriás mérésére nem állt rendelkezésre standardizált mérési módszer. A későbbiekben az ISTH (International Society of Thrombosis and Hemostasis) egy ajánlást fogadott el, amelyhez az általunk kidolgozott többlépcsős módszer nagymértékben hasonlít [152,153].

SAJÁT MÓDSZERÜNK ÖSSZEFOGLALÁSA

3.3.a. A CD markerek és fluoreszcens jelölések kiválasztása

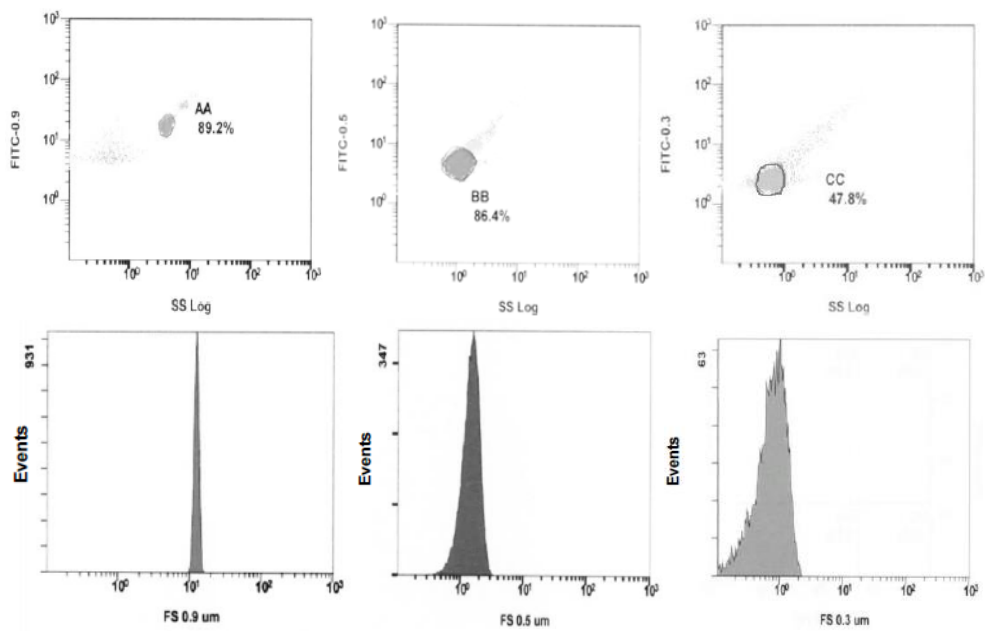
6. Táblázat: A mérésekhez kiválasztott CD markerek, sejteredetük, fluoreszcens jelölésük a gyártó megnevezésével.

CD marker	Sejteredet	Fluoreszcens jelölés	Gyártó
CD61 (GPIIb/IIIa)	Trombocita	FITC	Beckman-Coulter
CD41 (GPIIb/IIIa)		Cy5	Becton-Dickinson
CD42a (GPIb/V/IX)		FITC	Becton-Dickinson
PAC1 (GPIIb/IIIa)		FITC	Becton-Dickinson
CD31 (PECAM-1)	Endotél sejt	PE	Becton-Dickinson
CD62E (ELAM-1/E-szelektin)		PE	Becton-Dickinson
CD45	Pán leukocita	FITC	Beckman-Coulter
CD13 (Aminopeptidáz N)	Leukocita (neutrofil, eozinofil, bazofil, monocita)	PE	Beckman-Coulter
CD14 (LPS-R)	Monocita	PE	Beckman-Coulter
CD235 (Glycophorin A)	Vörösvértest	PE	Becton-Dickinson
CD56	NK, LGL sejt	Cy5	Becton-Dickinson
Annexin V	Általános, PS-hez kötődik	FITC, Cy5	Becton-Dickinson
Egér IgG1	Izotípus kontroll	FITC, PE, Cy5	Becton-Dickinson

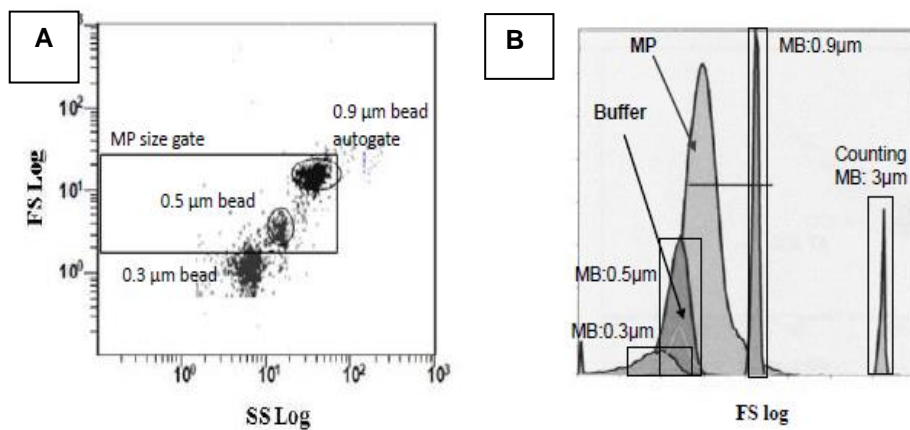
Rövidítések: FITC: fluoreszcein izothyocianát; PE: phycoerythrin; Cy5: Cychrom5 (PE-Cy5 konjugátum); Ig: immunglobulin; LPS-R: lipopoliszaharida receptor, NK: natural killer; LGL: large granular lymphocyte, NCAM: neural cell adhesion molecule; PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule.

3.3.b. A mikropartikulum méretkapu meghatározása

A MP méretkapu meghatározásához - melynek létrehozása a valódi események elkülönítéséhez szükséges az elektromos háttérzajtól és a háttértől - FITC-el jelölt 0,3-0,5-0,9 µm átmérőjű polisztrén mikrogöngyöket használtunk (a SoftFlow KFT, Pécs, Magyarország ajándéka). A FS, SC és fluoreszcens csatornákat logaritmikus skálára állítottuk. A MP-ok számának meghatározásához ismert koncentrációjú (1×10^5 /ml) 3µm átmérőjű számláló mikrogöngyöket használtunk (Becton-Dickinson, Magyarország) (6. Ábra).



6. Ábra. 0,9-0,5-0,3 μm -es mikrogyöngyök megjelenése SC/FL1 és FS csatornán.

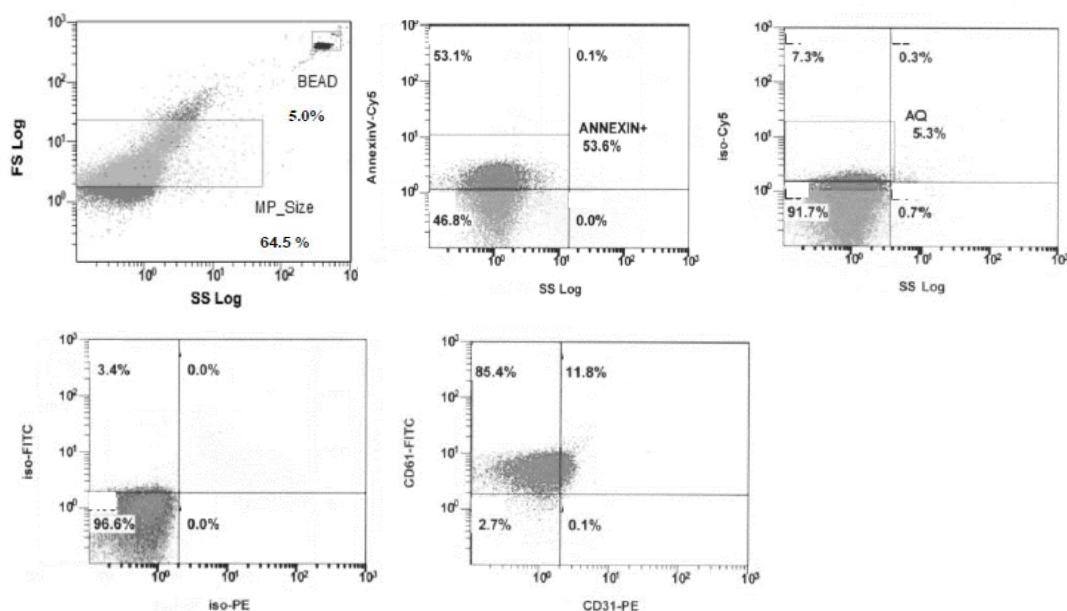


7. Ábra. MP méretkapu meghatározása mikrogyöngyök segítségével. Rövidítések: MB: microbead; MP: mikropartikelum; FS: forward scatter; SS: side scatter.

A MP méretkapu alsó határát a 0,5 μm -es gyöngy alsó részénél határoztuk meg (küszöb) mivel az FS/SC hisztogramon az ez alatti mérettartományban a 0,3 és 0,5 μm nagyságú mikrogöngyök átfedést mutatnak, vagyis itt a citométer már nem tudná egyenként elkülöníteni a MP-kat. A méretkapu felső határát a 0,9 μm -es mikrogöngy felső és külső részénél határoztuk meg. Ebben a MP méretkapuban a puffer és a MP-ot tartalmazó minta elválik a háttértől és az elektromos háttérzajtól. A MP méretkaput a későbbi mérések során autogate-ként használtuk (7. Ábra).

3.3.c. A mikropartikulum méretkapun belül az AnnexinV pozitív mikropartikulumok meghatározása

A MP méretkapun belül MP-ként határoztuk meg azokat az eseményeket melyek a fluoreszcensen jelölt AnnexinV-vel pozitívak és fluoreszcencia intenzitásuk az izotípus kontroll és a mintát nem tartalmazó puffer felett van. Különböző sejteredetű MP-ként határoztuk meg a méretkapun belül AnnexinV⁺ és az adott sejtre jellemző CD markerrel pozitív eseményeket, melyek fluoreszcencia intenzitása az izotípus kontroll és a mintát nem tartalmazó puffer felett van (8. Ábra). A méretkapun belüli összMP számot is (AnnexinV⁺/AnnexinV⁻) minden esetben meghatároztuk.



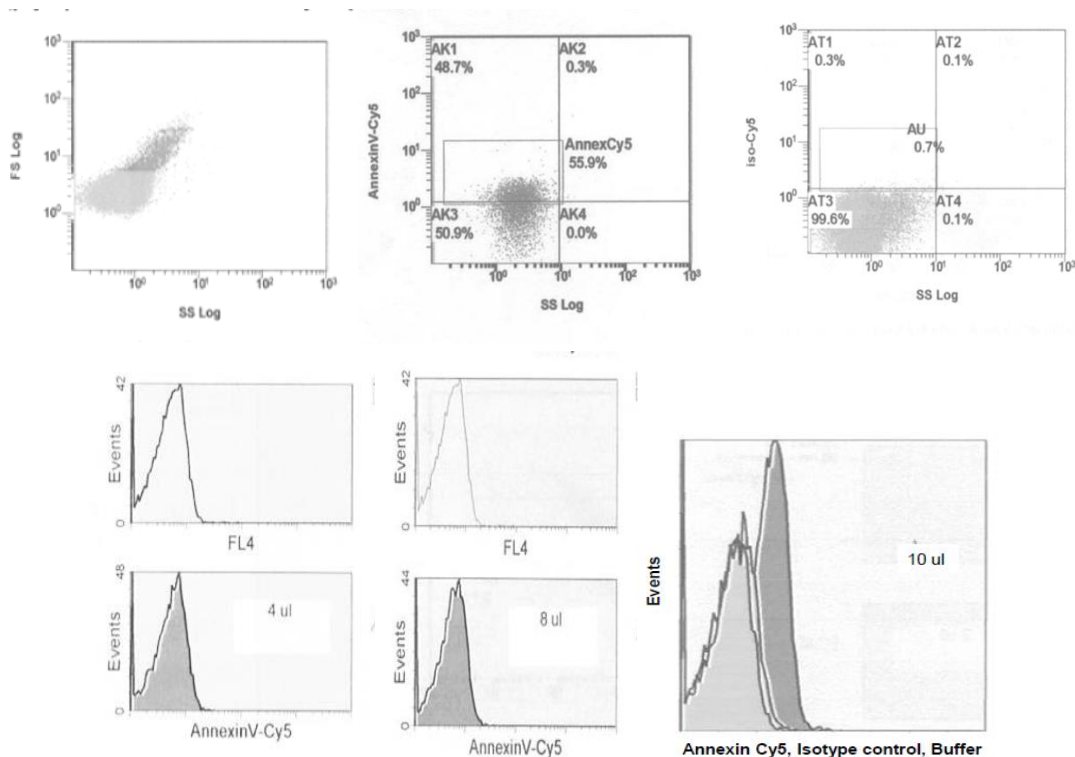
8. Ábra. AnnexinV⁺ események meghatározása a MP méretkapun belül az izotípus kontroll levonása után. AnnexinV, trombocita (CD61) és endotél (CD31) marker⁺ MP-ok.

A mikropartikulum szám kiszámítására az alábbi képletet használtuk:

MP szám ($10^5/\text{ml}$) = (AnnexinV⁺ MP események száma a méretkapun belül/ Számláló gyöngy események száma) X számláló gyöngy koncentrációja

3.3.d. A fluoreszcensen jelölt CD markerek optimális jelölési koncentrációjának meghatározása és a mikropartikulumok jelölése

A fluoreszcens jelölésű CD markerek optimális jelölési koncentrációjának meghatározásához az ismert koncentrációjú antitestekből hígítási sort készítettünk, mellyel megjelöltük a MP-ot nem tartalmazó Apo-puffert és a MP mintát. Optimálisnak tekintettük azt az antitest jelölési koncentrációt, ahol a MP-t tartalmazó minta eseményszáma tisztán elkülöníthető volt a puffertól és az izotípus kontroll háttértől. Az antitesttitrálást az AnnexinV Cy5 markeren keresztül mutatjuk be. Az antitest koncentrációja 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ezt 10x-re hígítottuk melyből 4-8-10 μl -t használtunk a jelöléshez. Az optimális antitest jelölő koncentráció 10 μl a 10x-es hígítású antitestből (9. Ábra). Az AnnexinV esetében a jelölést CaCl₂-ot tartalmazó és mentes pufferben is elvégeztük.



9. Ábra. AnnexinV Cy5-el jelölt marker jelölő koncentrációjának optimalizálása.

Az eddigiek alapján tehát MP-nak tekintettünk minden olyan eseményt, mely az általunk meghatározott MP kapuba esett, AnnexinV-el jelölődött és fluoreszcencia intenzitása meghaladta az izotípus kontrollét. A MP-ok sejteredetének meghatározásához a megfelelő fluoreszcensen jelölt optimálizált jelölő koncentrációjú CD markert használtuk.

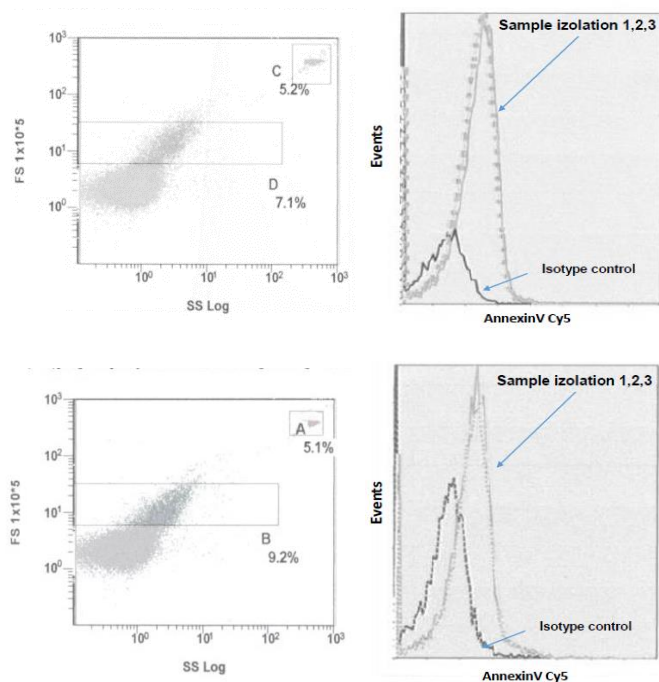
A MP jelöléshez az izolált Apo-binding pufferben felvett mintából 10µl-t jelöltünk 100µl 2,5mmol/l CaCl₂-al kiegészített Apo-binding pufferben, az előzőleg optimális jelölőkoncentrációra hígított 10µl végtérfogatban felvett antitesttel. A minták jelölése 30 percig sötétszobában, szobahőmérsékleten történt. Az eredmények kiértékelése CXP software segítségével történt.

3.4. Pozitív és negatív kontroll mérése

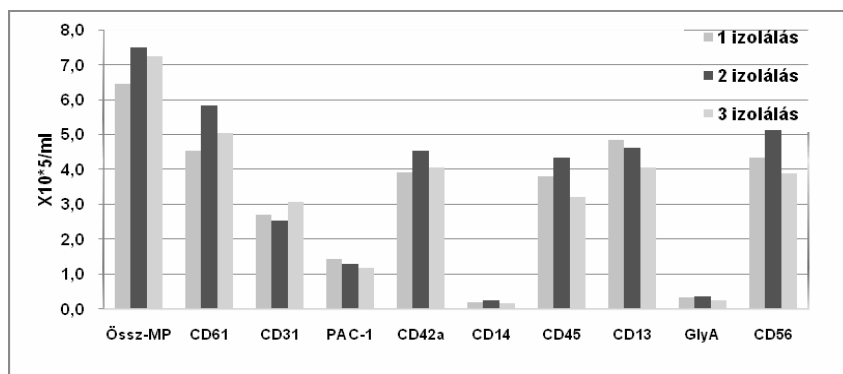
Pozitív kontrollként egészséges önkéntesektől gyűjtött trombocita dús plazma kalcium ionophore-al A23186 (Sigma Aldrich, 25 µmol/ml) való stimulálása után izolált MP-at használtunk. A kalcium ionophore hatására megemelkedik az intracelluláris Ca²⁺ szint, mely a floppáz aktiválásához és a membrán foszfolipid asszimetria elvesztéséhez vezet. Ennek eredményeként nagy mennyiségben keletkeznek trombocita eredetű MP-ok. Negatív kontrollnak AnnexinV-el jelöltük a MP-at 2,5 mmol/l EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) jelenlétében. Az EDTA kelátképző tulajdonságának köszönhetően a kalciumot elvonja a rendszerből, ennek eredményeként az AnnexinV nem tud kötődni a MP-ok felszínén lévő PS-hez, így nincs jelölődés.

3.5. Reprodukálhatóság

A módszer reprodukálhatóságának tesztelése érdekében két önkéntes egészséges egyéntől két különböző időpontban vettünk le három-három mintát. A minták izolálását, CD markerekkel való jelölését és mérését egymás után végeztük el (10-12. Ábrák, 7-8. Táblázatok).



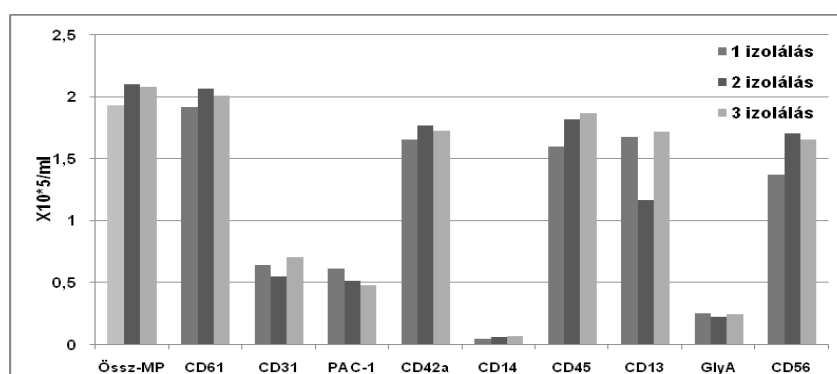
10. Ábra. Két kontroll három egymás utáni izolálás és mérés – AnnexinV jelölés.



11. Ábra. Egyes számú kontroll esetén három párhuzamos izolálás, jelölés és mérés után az össz és a különböző CD markerekkel jelölődő MP mennyiségek.

7. Táblázat: Egyes számú kontroll, a módszer reprodukálhatósága: mintavétel, izolálás, jelölés, mérés – variációs koefficiens számítás.

Kontroll 1	Átlag	Szórás	VK%
Annexin V ⁺ összMP	7,05	0,53	7,63
CD61	5,14	0,64	12,63
CD31	2,77	0,27	9,81
PAC-1	1,30	0,12	9,59
CD42a	4,16	0,32	7,76
CD14	0,20	0,04	20,4
CD45	3,79	0,57	15,0
CD13	4,51	0,39	8,79
GlyA	0,31	0,05	16,2
CD56	4,46	0,63	14,17



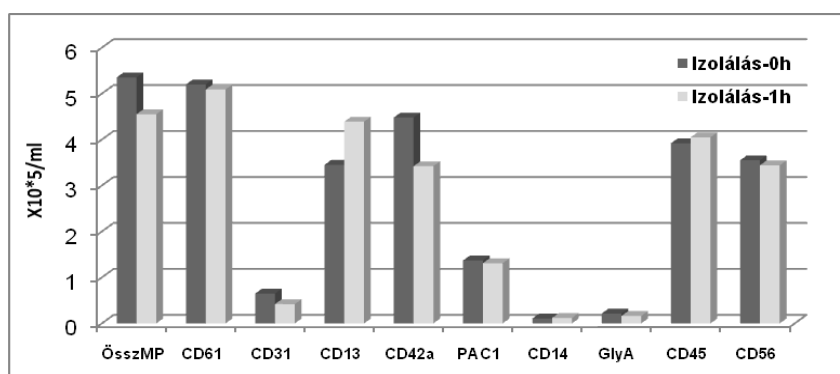
12. Ábra. Kettes számú kontroll esetén három párhuzamos izolálás, jelölés és mérés után az össz és a különböző CD markerekkel jelölődő MP mennyiségek.

8.Táblázat: Kettes számú kontroll, a módszer reprodukálhatósága: mintavétel, izolálás, jelölés, mérés – variációs koefficiens számítás.

Kontroll 2	Átlag	Szórás	VK%
Annexin V ⁺ összMP	2,03	0,09	4,56
CD61	1,99	0,08	3,82
CD31	0,63	0,08	12,66
PAC-1	0,53	0,07	13,07
CD42a	1,72	0,06	3,23
CD14	0,06	0,01	19,67
CD45	1,76	0,14	8,18
CD13	1,52	0,30	20,07
GlyA	0,24	0,02	6,17
CD56	1,58	0,18	11,58

3.6. A mintavételtől eltelt idő befolyása a mért mikropartikulum mennyiségekre

Megnéztük, hogy a mintavétel ideje után az izolálás időpontja mennyiben befolyásolja az össz és a különböző CD markerekkel jelölődő MP-ok mennyiségét. Az azonnal izolált és az 1 órás időbeli eltolódással nyert MP-ok számában nem látható szignifikáns különbség (**13. Ábra**).

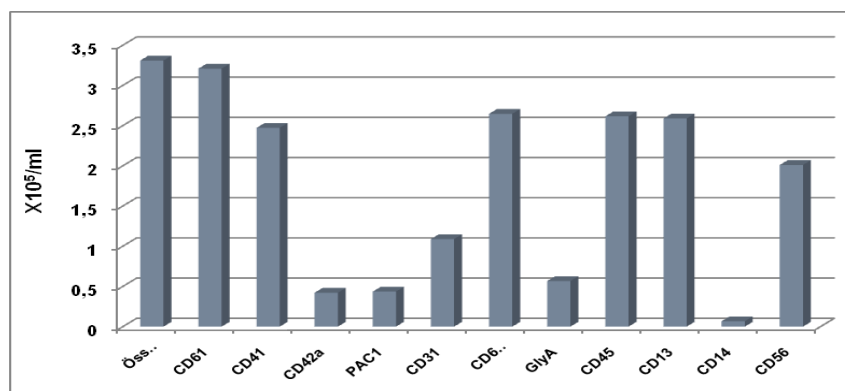


13. Ábra. A mintavétel után azonnal és 1 órás különbséggel izolált össz és különböző CD markerekkel jelölődő MP mennyiségek.

4. A módszer alkalmazása betegeken

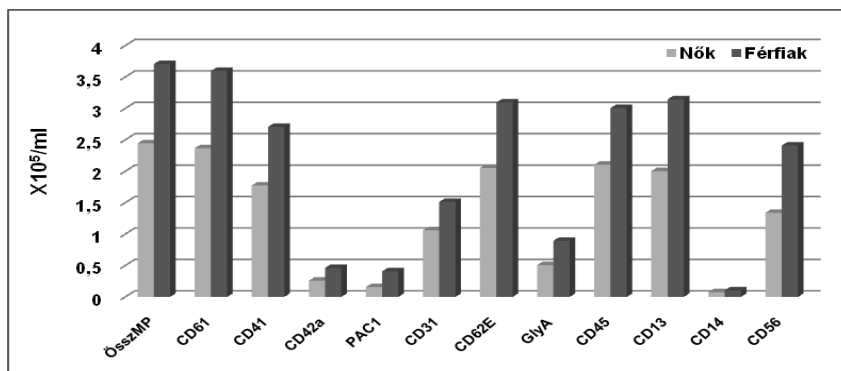
4.1. Kontroll csoport kialakítása, referencia tartomány számítás, a módszer tesztelése

A kontroll csoportot 20 önkéntes, egészséges egyénből alakítottuk ki. Nem szerinti megoszlásuk: 10 férfi és 10 nő. Életkoruk mediánja 57 év (25-75 percentilis: 49-63). Életkor tekintetében beválasztási szempontként a később vizsgálni kívánt betegcsoportjaink életkorát vettük figyelembe, ahhoz alakítottunk ki hasonló életkorú kontroll csoportot. Kizáró kritériumnak tekintettük az akut infekciót, az anamnézisben előforduló ismert hematológiai betegséget, citosztatikus kezelést az elmúlt 3 hónapban, nagy dózisú, hosszan tartó szteroid kezelést, a trombociták funkcióját befolyásoló gyógyszerek (pl. acetil-szalicilsav) szedését, vér transfúzió vagy disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC>5 score-al) előfordulását az előző néhány hónapban, valamint diagnosztizált antifoszfolipid szindrómát (APS). A kontroll csoportban mért össz és különböző CD markerekkel jelölődő MP mennyiségek átlagát a **14. Ábra** mutatja be.



14. Ábra. A kontroll csoportban mért össz és különböző CD markerekkel jelölődő MP mennyiségek átlaga.

A kontroll csoport nők és férfiakra való bontása után kapott össz és a különböző CD markerekkel jelölődő mikropartikulum mennyiségek átlagát a **15. Ábra** mutatja be.



15. **Ábra.** A MP mennyiségek átlag értékének megoszlása a kontroll csoporton belüli nők és férfiak között.

A kontroll csoportban mért MP mennyiségek eloszlása nem mutat Gauss eloszlást, ezért a referencia tartomány kialakításához az $X \pm 1,96 SD$ (X :átlag, SD :standard deviáció) képlet nem alkalmazható. Helyette a nem normál eloszlás esetén használt percentilis eljárást alkalmaztuk (medián, 25% és 75% percentilis). Az így kapott referens értékeket a mért MP-ok vonatkozásában a teljes kontroll csoportban, valamint nemek szerint a **9. Táblázat** mutatja be.

9. Táblázat: Referencia tartomány (medián, 25% és 75% percentilis megadásával) a teljes kontroll csoportban valamint a kontroll csoport bontása után a nők és a férfiak között. Az értékek MPx10⁵/ml-ben megadva.

CD marker	Kontroll csoport n=20		Nők n=10		Férfiak n=10	
	Medián MPx10 ⁵ /ml	25 - 75% percentilis	Medián MPx10 ⁵ /ml	25 - 75% percentilis	Medián MPx10 ⁵ /ml	25 - 75% percentilis
Össz MP	2,20	(1,14 - 5,98)	2,03	(1,24 - 3,70)	2,67	(1,14 - 4,85)
CD61	2,11	(1,08 - 5,87)	1,94	(1,19 - 3,65)	2,57	(1,08 - 4,70)
CD41	1,51	(0,69 - 5,39)	1,44	(0,83 - 2,46)	1,84	(0,69 - 3,35)
CD42a	0,21	(0,05 - 1,06)	0,16	(0,05 - 0,32)	0,29	(0,07 - 0,79)
PAC1	0,17	(0,07 - 0,94)	0,13	(0,07 - 0,20)	0,25	(0,06 - 0,94)
CD31	0,83	(0,34 - 3,42)	0,76	(0,34 - 1,63)	0,98	(0,35 - 1,96)
CD62E	1,77	(0,90 - 5,62)	1,68	(0,93 - 3,17)	2,12	(0,90 - 4,11)
GlyA	0,29	(0,13 - 2,71)	0,23	(0,15 - 0,65)	0,53	(0,13 - 1,69)
CD45	1,90	(0,96 - 5,68)	1,78	(1,06 - 2,94)	2,24	(0,96 - 3,82)
CD13	1,64	(0,84 - 5,54)	1,57	(0,89 - 3,19)	2,12	(0,84 - 3,79)
CD14	0,07	(0,03 - 0,16)	0,07	(0,05 - 0,11)	0,09	(0,03 - 0,21)
CD56	1,05	(0,52 - 5,08)	0,93	(0,52 - 1,88)	1,23	(0,52 - 3,06)

A kontroll csoport plazmájában legnagyobb számban mért MP-ok az irodalmi adatoknak megfelelően trombocita eredetűek (CD61, CD41). Érdekes módon a teljes kontroll csoportban, valamint külön a férfiak és a nők csoportjában is a trombocita eredetű CD42a-val jelölődő MP mennyiség szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,001$), mint a szintén trombocita eredetű CD61⁺ és CD41⁺ MP mennyiségek. A PAC1 aktivációs marker pozitív PMP szám is szignifikáns különbséget mutat ($p < 0,001$) a CD61 és a CD41 trombocita markerekhez viszonyítva a teljes kontroll és külön a férfiak és a nők csoportjában is. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a trombocita felszínén lévő CD markerek más-más funkcióval rendelkező molekulákat ismernek fel a trombociták felszínén és az aktiválódást követően ezek más-más mennyiségben jelennek meg a vérlemezkéről leváló MP-ok felszínén. Az endotél eredetű CD31⁺ és CD62E⁺ MP számban is szignifikáns különbség ($p = 0,002$) mutatható ki a teljes kontroll csoporton belül. Ez a szignifikáns különbség ($p = 0,015$) a nők csoportján belül is kimutatható, míg

a férfiak csoportjában ez a különbség nem szignifikáns. A legkisebb mennyiségben a vörösvértest (GlyA) és a monocita (CD14) eredetű valamint az aktivációs trombocita markerrel (PAC1) jelölődő mikropartikulumok mutathatók ki. Az egyes CD markerek vonatkozásában a férfiak és a nők között szignifikáns különbség nem mutatható ki.

4.2. A módszer tesztelése betegeken

4.2.1. Szeptikus betegcsoport

4.2.1.a. A beteg csoport kialakítása

Vizsgálatainkat a 2003-as Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveinek megfelelően és a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatás-Értékelési Bizottságának engedélyével végeztük (2406/2005). A betegektől írásos beleegyező nyilatkozatot kértünk, miután a vizsgálatokról és a vérvételről részletes tájékoztatást kaptak. Vizsgálatainkba 27 frissen (24 órán belül) diagnosztizált két vagy több szervégtelenséggel rendelkező súlyos szeptikus beteget vontunk be az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet Intenzív Osztályáról.

A betegek szepszis besorolási kritériumai az alábbiak voltak: láz ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) vagy hipotermia ($\leq 36^{\circ}\text{C}$), tachikardia ($\geq 90/\text{perc}$), tachipnoe, megváltozott tudatállapot, hiperglikémia, leukocita szám (≥ 12.000 sejt/ μl vagy ≤ 4.000 sejt/ μl), emelkedett C-reaktív protein (CRP) ($\geq 10\text{mg/l}$) és szérum procalcitonin (PCT) ($\geq 5\text{ng/ml}$) szint [154]. Kizárási kritériumként a kontroll csoportnál felsoroltakat alkalmaztuk, kivéve az akut infekciót. A vizsgálat végpontjai: a beleegyezés visszavonása, ill. exitus a vizsgálat ideje alatt. A betegek demográfiai és klinikai (gyulladásos marker és állapot súlyossági) adatait a **10-11. Táblázatok** mutatják be. A diagnosztikai eljárások, a kezelés és szervtámogató kezelés az érvényben lévő ajánlásoknak megfelelően történt [154]. A klinikai státus követésére naponta történt a MODS (Multiple Organ Dysfunction Score) és SOFA (Sequential Organ-Failure Assessment) érték számítás [155,156].

Valamennyi betegről az intenzív osztályos felvételkor (első napon), valamint a 3. és 5. napon mintavétel és MP vizsgálat történt.

10. Táblázat: A kontroll és szeptikus betegek demográfiai és klinikai adatai.

	Szeptikus betegek	Kontroll csoport
Besoroltak száma	n=27	n=20
Kor*	65 (53-72)	57 (49-63)
Nem (F/N)	16/11	10/10
Számított klinikai score-ok		
MODS (1.,3.,5. napon)*	8 (5-9); 7 (6-10); 7 (6-10)	-
SOFA (1.,3.,5. napon)*	9 (6-11); 8 (5-9); 9 (5-11)	-
Szepszis markerek besoroláskor		
PCT*	14,6 (6,5-97,9)	-
CRP*	239 (155,1-319,5)	-
Laktát*	2,13 (1,37-5,52)	-
Szervelégtelenségek száma		
Vese	4 (3-5)	-
Vese	26 (96)	-
Tüdő	22 (81)	-
Katekolamin szükséglet	21 (78)	-
Máj	11 (41)	-
Trombocitopénia	8 (30)	-
Megváltozott tudatállapot	19 (70)	-
Gram-pozítív	16 (59)	-
Gram-negatív	20 (74)	-
Gomba	6 (22)	-

Rövidítések: PCT: procalcitonin; CRP: C-reaktív protein; MODS: multiorgan dysfunction score; SOFA: Sequential Organ Failure Assessment. Az adatok, mint abszolút érték (%) és medián* (25-75 percentilis) vannak megadva.

11. Táblázat: Szeptikus betegek demográfiai és klinikai kimeneteli adatai besoroláskor.

	Túlélő (n=20)	Nem túlélő (n=7)	p-érték
Kor*	63 (51-71)	63 (50-72)	NS
Nem (F/N)	12/8	4/3	NS
Szepszis markerek besoroláskor			
PCT*	13,2 (5,4-70,4)	11,9 (5,1-71,2)	NS
CRP*	185,8 (103,4-289,1)	179,1 (96,2-270,5)	NS
Laktát*	1,66 (1,26-2,74)	1,70 (1,29-2,48)	NS

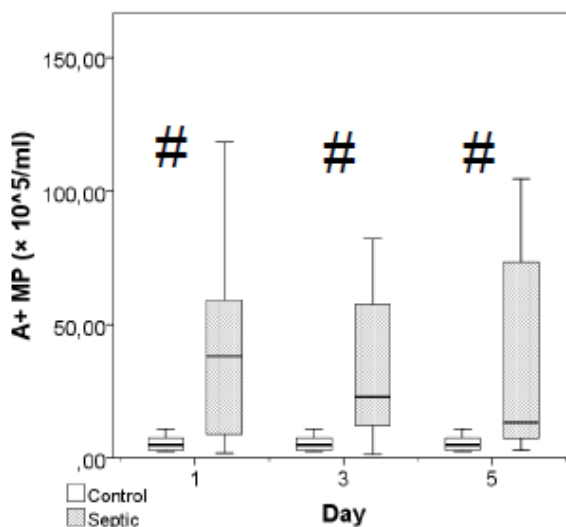
Rövidítések: PCT: procalcitonin; CRP: C-reaktív protein; Az adatok, mint abszolút érték és medián* (25-75 percentilis) vannak megadva.

4.2.1.b. Statisztikai analízis

A statisztikai értékeléshez az SPSS 19 program Windows software-hez kifejlesztett változatát használtuk. A kontroll és szeptikus betegcsoportok összehasonlításához Mann-Whitney U- tesztet alkalmaztunk. A súlyos szeptikus betegek alcsoportjainak elemzéséhez Kruskal-Wallis tesztet használtunk. A korreláció analízis Spearman's rho segítségével történt. A számításokban szignifikánsnak tekintettük a $p < 0,05$ értéket.

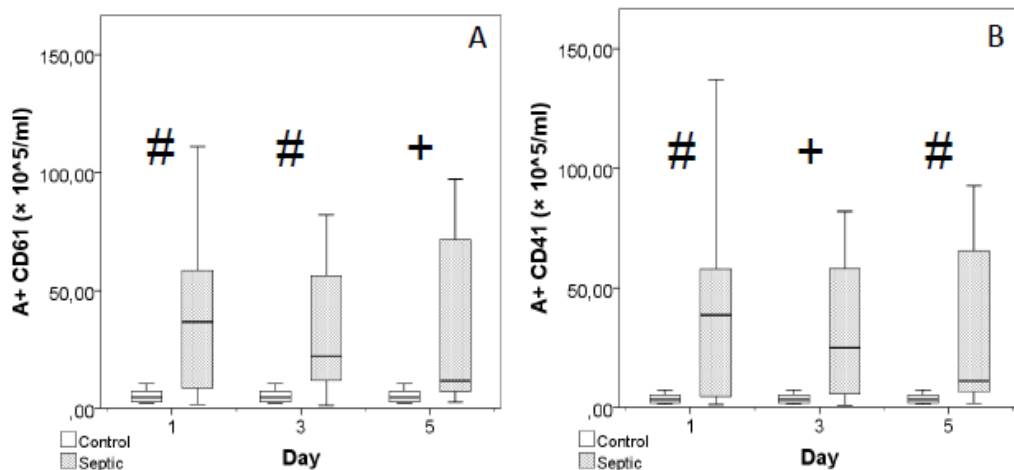
4.2.1.c. Eredmények

Mindhárom mérési időpontban (1., 3. és 5. napon) szignifikánsan magasabb össz mikropartikulum számot mértünk a septicus betegek körében a kontroll csoporthoz viszonyítva (valamennyi $p < 0,001$, **16. Ábra**). Ugyanakkor az össz mikropartikulum mennyiség dinamikáját nézve a medián értéke fokozatosan csökkenő tendenciát mutatott az 5.-ik vizsgálati nap végére, de a változás nem volt szignifikáns.



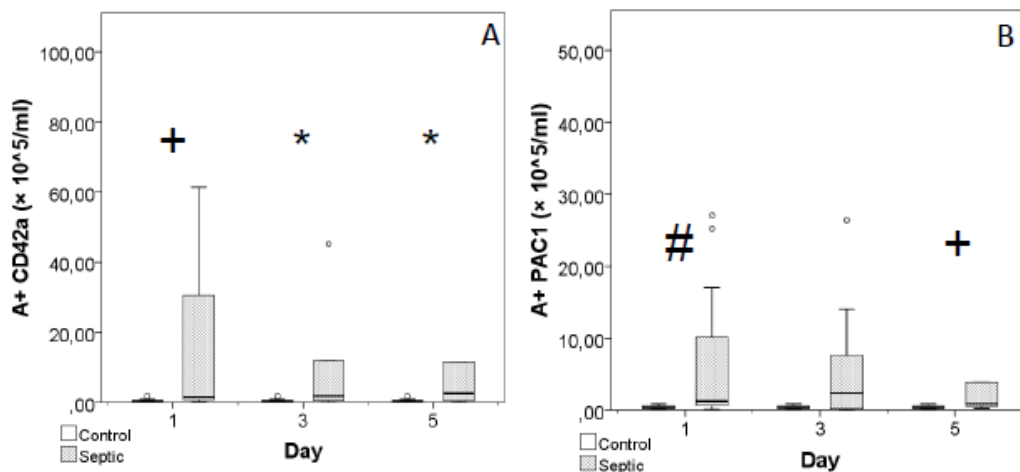
16. Ábra. Az összMP szám változás az 1., 3. és 5. vizsgálati napon septicus betegekben a kontroll csoporthoz viszonyítva (medián és IQR, # $p < 0,001$).

A MP-ok nagy része kettős jelölődést mutatott CD41 és CD61 trombocita markerekkel. Az Annexin V pozitív és CD61-et expresszáló MP-ok száma a vizsgálat ideje alatt valamennyi időpontban szignifikáns emelkedést mutatott a septicus betegcsoportban a kontrollhoz viszonyítva (# $p < 0,001$; + $p < 0,01$, **17. Ábra - A**). A CD41 pozitív MP-ok száma is szignifikáns növekedést mutatott mindhárom mérési napon a septicus betegek esetében ((# $p < 0,001$; + $p < 0,01$, **17. Ábra - B**). Mindkét trombocita marker esetében megfigyelhető az enyhe MP szám csökkenés az 5.-ik vizsgálati nap végére, ami az össz MP szám esetében is megfigyelhető volt.



17. Ábra. A trombocita eredetű CD61⁺ (A) és CD41⁺ (B) mikropartikelum szám az 1., 3. és 5. vizsgálati napon szeptikus betegekben a kontroll csoporthoz viszonyítva (median és IQR, #p<0,001, +p<0,01).

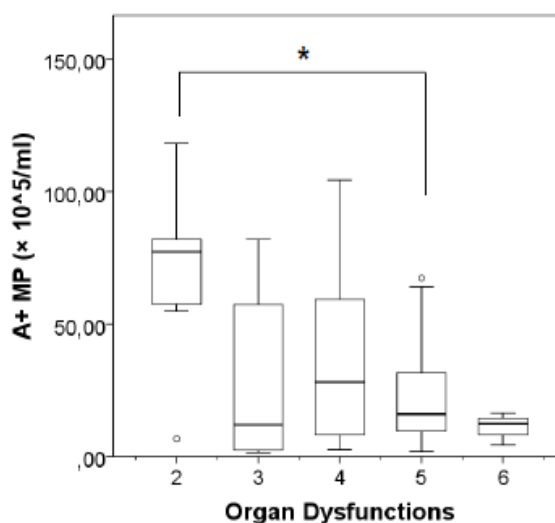
A CD42a trombocita marker pozitív MP szám az 1. 3. és 5.-ik napon mutatott emelkedést a szeptikus betegek esetében. (+p<0,01; *p<0,05, **18. Ábra - A**) Az aktivációs PAC1 trombocita markert hordozó MP-ok száma viszont szignifikáns csökkenést mutatott az 1. és az 5.-ik vizsgálati napon (#p<0,001; +p<0,01, **18. Ábra - B**).



18. Ábra. A trombocita eredetű CD42a⁺ (A) és az aktivációs PAC1 marker (B) pozitív mikropartikelum szám az 1., 3. és 5. vizsgálati napon szeptikus betegekben a kontroll csoporthoz viszonyítva. (median és IQR, #p<0,001, +p<0,01, *p<0,05).

A három különböző vizsgálati napon mért CD62E⁺ endotél eredetű MP szám statisztikai elemzése nem mutatott szignifikáns eltérést a szeptikus és kontroll csoport viszonylatában (adat nincs feltüntetve).

A 20 túlélő és a 7 nem túlélő septicus beteg MP eredményeinek statisztikai elemzése során nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között egyik vizsgálati időpontban sem. A szervelegtelenések száma és az össz MP szám közötti összefüggés statisztikai vizsgálata során szignifikáns különbséget lehet kimutatni a 2 szervet és az 5 szervet érintő szervelegtelenég esetén. Két szervelegtelenég esetén az össz MP szám szignifikánsan megemelkedett az öt szervelegtelenégben szenvedőkhöz képest. ($p < 0,05$, **19. Ábra**).



19. Ábra. Az össz mikropartikulum szám változás septicus betegekben a szervelegtelenések számának függvényében (median és IQR, $*p < 0,05$).

A kibővített beteganyagból két cikk került közlésre, mely nem képezi a dolgozat anyagát:

Tőkés-Füzesi M*, Woth G*, Ernyey B, Vermes I, Mühl D, Bogár L, Kovács GL. Microparticles and acute renal dysfunction in septic patients J Crit Care. 2013 apr. Vol: 28(2): 141-147. * jel egyenlő hozzájárulást jelent a két szerző részéről

Woth G*, **Tőkés-Füzesi M***, Magyarlaci T, Kovács GL, Vermes I, Mühl D. Activated platelet-derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (Candida albicans) sepsis Ann Clin Biochem. 2012 Vol.:49(6): 554-560. * jel egyenlő hozzájárulást jelent a két szerző részéről

4.2.2. A krónikus obstruktív tüdőbeteg (COPD-s) csoport

4.2.2.1. Prospektív vizsgálat COPD-s betegek

4.2.2.1.a. A beteg csoport kialakítása

A vizsgálatba összesen 50 COPD-ben szenvedő beteget vontunk be a 2008-2010 közti időszakban. Beválasztásuk a tüdőgyógyászati szakrendelésen és a Megyei Tüdőgondozóban kontroll vizsgálatra jelentkeztek köréből illetve az I.sz. Belgyógyászati Klinika Pulmonológia osztályán korábban kezelt betegek behívásával történt. Az exacerbálódott betegek esetében a vizsgálat és a mintavétel osztályos felvétel után került elvégzésre. Vizsgálatainkat a Pécsi Tudományegyetem Regionális Kutatásetikai Bizottságának engedélyével végeztük (3429/2009). A betegek miután a vizsgálatokról és a vérvételről tájékoztatást kaptak, aláírásukkal hivatalos beleegyezésüket adták a vizsgálathoz.

Két betegcsoport került kialakításra:

1. stabil COPD-s betegek (34 beteg)
2. COPD-s betegek akut exacerbációban (16 beteg)

A betegek súlyosságát a GOLD stádium besorolás alapján végeztük el. Ennek lényege, hogy a COPD súlyossági besorolása hörgőtágító inhalációja utáni FEV1-érték (az első másodpercben mért térfogat erőltetett kilégzés közben) alapján történik (Magyar Tüdőgyógyász Társasági ajánlása, GOLD stádiumok, 2006):

I. enyhe: $FEV1 \geq 80$ referencia% (ref%)	}	tünetmentes vagy panaszos
II. középsúlyos: $50 \text{ ref}\% \leq FEV1 < 80 \text{ ref}\%$		
III. súlyos: $30 \text{ ref}\% \leq FEV1 < 50 \text{ ref}\%$		
IV. nagyon súlyos: $FEV1 < 30 \text{ ref}\%$ vagy $FEV1 < 50 \text{ ref}\%$ + krónikus légzési elégtelenség ($PaO_2 < 60 \text{ Hgmm}$ +/- $PaCO_2 > 50 \text{ Hgmm}$) vagy cor pulmonale tünetei		

Mind a négy stádiumban igazolható légúti obstrukció: FEV1/FVC (erőltetett kilégzési vitálkapacitás) $< 70\%$ [157]. Exacerbálnak tekintettük azokat a beteget, akik kórházi beutalásra szorultak, és akiknél sürgős intravénás kortikoszteroid kezelést kellett indítani a súlyosbodó tüneteik miatt pl. a köpetmennyiség növekedése, köhögés vagy

respiratorikus distressz jelei. Stabil COPD-s csoportba soroltuk be a rendszeres éves ellenőrzésre jelentkező betegeket, akiknek nem voltak új tünetei.

4.2.2.1.b. Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez az SPSS 22 program Windows software-hez kifejlesztett változatát használtuk. A betegcsoportok összehasonlításához Mann-Whitney U- és Kruskal Wallis tesztet alkalmaztunk. A kategorikus változók összehasonlítására Chi-square tesztet használtunk. A korreláció analízis Spearman's rho segítségével történt. Az adatokat medián, interquartilis tartományban adtuk meg. A számításokban szignifikánsnak tekintettük a $p < 0,05$ értéket.

4.2.2.1.c. Eredmények

A betegek demográfiai, klinikai, gyógyszereszedési, légzésfunkciós és rutin laboratóriumi adatait a **12. Táblázatban** tüntettük fel. A kontroll csoport ebben az esetben is a korban illeszkedő önkéntes, társbetegségektől mentes egyénekből ($n=19$) állt. A kontroll egyének átlag életkora 57 év (49-63), nő:férfi megoszlás 10:9, a dohányzók száma 8 (42%) volt.

12. Táblázat: Demográfiai, klinikai, gyógyszereszedési és légzésfunkciós adatok a stabil és exacerbációs (AECOPD) betegekben.

	Stabil COPD (n=34)	AECOPD (n=16)	p-érték
Kor*	63 (54-70)	63 (56-67)	0,755
Férfi[#]	20 (59)	9 (56)	0,863
Krónikus társbetegség			
DM [#]	2 (6)	5 (31)	0,03
CVD [#]	20 (58)	9 (56)	0,863
Dohányzás[#]	20 (59)	10 (62)	0,804
Gyógyszereszedés			
Ca-csatorna blokkoló [#]	8 (23)	10 (62)	0,009
β-blokkoló [#]	17 (50)	7 (44)	0,680
ACEI [#]	13 (38)	6 (37)	0,898
Statin [#]	2 (6)	3 (19)	0,320
ICS [#]	25 (74)	14 (87)	0,464
LABA [#]	26 (77)	14 (87)	0,698
LAMA [#]	32 (94)	14 (87)	0,245
Légzésfunkció			
FEV1/FVC*	0,56 (0,41-0,63)	0,49 (0,37-0,55)	0,179
FEV1 ref%*	0,52 (0,36-0,67)	0,56 (0,45-0,67)	0,925
GOLD stádium			
GOLD I-II [#]	21 (62)	10 (62)	0,96
GOLD III-IV [#]	13 (32)	6 (37)	0,96
Rutin laboratóriumi paraméterek			
Koleszterin* (mmol/L)	5,50 (5,00-6,80)	4,95 (4,10-6,10)	0,151
VVT szám* (T/L)	4,89 (4,43-5,22)	4,99 (4,49-5,29)	0,677
TCT szám* (G/L)	232 (172-276)	267 (195-328)	0,112
FVS szám* (G/L)	7,55 (5,76-9,76)	13,53 (8,99-15,85)	<0,001
hs-CRP* (mg/L)	5,65 (3,50-8,30)	9,67 (2,93-23,61)	0,114

Az adatok, mint medián (IQR)* és n (%)[#] vannak megadva. A változók összehasonlítására Mann-Whitney U és Chi-square tesztet használtunk. DM: diabétesz mellitusz; CVD: kardiovaszkuláris betegség; ACEI: angiotenzin konvertáló enzim inhibitor; ICS: belélegzett kortikoszteroid; LABA: hosszan ható β-agonista; LAMA: hosszan ható muscarin antagonist; GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; FEV1: erőltetett kilégzési térfogat az 1. másodpercben; FVC: erőltetett vitál kapacitás; VVT: vörös vértess; TCT: trombocita; FVS: fehérvérsejt; hs-CRP: magas szenzitivitású C-reaktív protein.

A COPD-ben szenvedő betegekben, exacerbációtól függetlenül szignifikánsan magasabb MP számok mérhetőek a kontroll csoporthoz képest. A CD62E⁺, CD41⁺, CD42a⁺, CD14⁺ mikropartikulum mennyiségek szignifikánsan emelkedett értéket mutatnak az exacerbációban szenvedőkben, a stabil betegekhez képest (**13. Táblázat**).

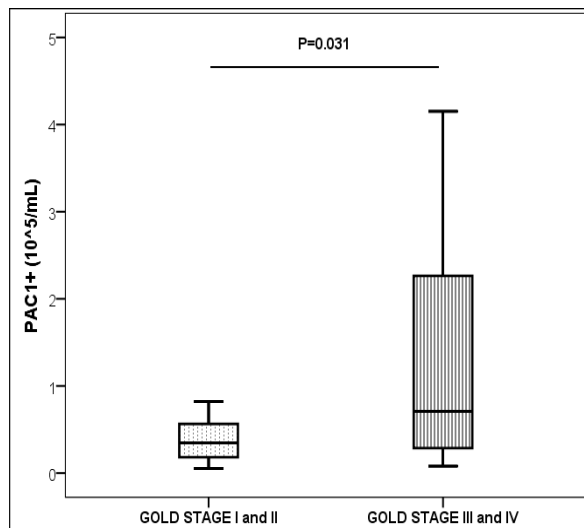
13. Táblázat: Mikropartikulumok száma a kontroll csoportban valamint stabil és exacerbációban szenvedő COPD-s betegekben.

CD marker (X10 ⁵ /mL)	Kontroll (n=19)	Stabil COPD (n=34)	AECOPD (n=16)	<i>p</i> -érték Kontroll vs stabil/AECOPD	<i>p</i> -érték Stabil vs. AECOPD
Annexin V+	2,18 (1,33-3,70)	53,74 (35,08-76,38)	61,15 (44,26-73,39)	<0,001	0,747
CD31+	0,79 (0,48-1,40)	10,35 (7,78-17,04)	15,59 (11,82-21,95)	<0,001	0,164
CD62E+	1,72 (0,97-3,17)	29,87 (26,85-40,58)	44,09 (33,43-59,21)	<0,001	0,011
CD61+	2,10 (1,22-3,65)	48,36 (32,02-73,68)	54,99 (38,18-65,73)	<0,001	0,992
CD41+	1,51 (0,90-2,46)	37,99 (32,69-52,59)	61,15 (44,25-73,39)	<0,001	0,018
CD42a+	0,17 (0,12-0,30)	1,32 (0,92-1,51)	3,19 (1,49-5,69)	<0,001	0,002
PAC1+	0,15 (0,09-0,23)	0,57 (0,28-3,05)	0,52 (0,15-0,76)	<0,001	0,182
GlyA+	0,28 (0,16-0,59)	8,21 (6,76-11,59)	11,93 (5,03-18,98)	<0,001	0,133
CD45+	1,88 (1,10-2,94)	37,67 (26,34-59,24)	43,21 (20,29-60,07)	<0,001	0,670
CD13+	1,62 (0,99-3,19)	30,37 (21,32-55,00)	41,44 (26,91-46,07)	<0,001	0,904
CD14+	0,07 (0,06-0,11)	0,29 (0,08-0,48)	0,624 (0,44-0,98)	<0,001	0,008
CD56+	1,02 (0,63-1,88)	43,99 (32,81-54,94)	61,15 (42,02-73,40)	<0,001	0,240

Az adatokat, mint medián és (IQR) ábrázoltuk. Kruskal-Wallis teszt.

GOLD stádium alapján egy mikropartikulum esetében mutattunk ki különbséget. A PAC1⁺ MP-ok száma szignifikánsan magasabb volt a súlyosabb COPD-ben (GOLD III-IV) szenvedőkben, mint GOLD I-II stádium esetén (**20. Ábra**).

Többváltozós analízissel fordított korrelációt találtunk a CD62E⁺, CD42a⁺ és a CD14⁺ MP mennyiségek valamint az erőltetett kilégzési vitálkapacitás a FEV1/FVC (-0,406, -0,473, -0.440, p<0,001) között.



20. **Ábra.** PAC1⁺ mikropartikelumok számának összehasonlítása a GOLD I-II vs. III-IV stádiumú betegekben (median és IQR, p=0,031).

4.2.2.2. Retrospektív vizsgálat a COPD-s betegcsoportban

2018-ban elvégeztük a 2010-ben vizsgált COPD-s betegcsoportunk retrospektív vizsgálatát. A különböző sejteredetű MP-k és a 7 éves kimenetel közötti összefüggésekre voltunk kíváncsiak. A vizsgálatainkba 2010-ben bevont 50 betegből (34 stabil, 16 exacerbált), mind az 50 beteg elektronikus adatbázisban (eMedSol) rögzített adatait sikerült követnünk. A mintavételt követő 7 évben visszamenőleg valamennyi betegnél regisztráltuk a súlyos, kórházi felvételt igénylő exacerbációk számát, az SBO megjelenéseket, valamint a halálozás dátumát. A betegek demográfiai, klinikai és légzésfunkciós adatait a **14. Táblázat** mutatja be.

14. Táblázat: Demográfiai, klinikai és légzésfunkciós adatok a túlélő és nem túlélő COPD-s betegekben.

	Túlélő (n=30)	Nem túlélő (n=20)	p-érték
Kor*	66 (56-70)	62 (56-64)	NS
Stabil COPD	21 (70%)	13 (65%)	NS
AECOPD	9 (30%)	7 (35%)	NS
Exacerbációk* Szama	2 (1-4)	4 (2-6)	0,006
GOLD stádium*	2 (2-3)	2 (2-3)	
FEV1/FVC*	0,54 (0,41-0,62)	0,51 (0,31-0,57)	NS
FEV1 ref%*	0,52 (0,44-0,67)	0,61 (0,29-0,67)	NS
FVS szám* (G/L)	7,69 (6,2-10,63)	9,79 (7,65-12,24)	NS
hs-CRP* (mg/L)	5,6 (3,50-10,2)	7,9 (2,9-10,8)	NS

Az adatok, mint medián (IQR) *vannak megadva. A változók összehasonlítására Mann-Whitney U és Chi-square tesztet használtunk. GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; FEV1: erőltetett kilégzési térfogat az 1. másodpercben; FVC: erőltetett vitál kapacitás; FVS: fehérvérsejt; hs-CRP: magas szenzitivitású C-reaktív protein.

4.2.2.2.a. Statisztikai analízis

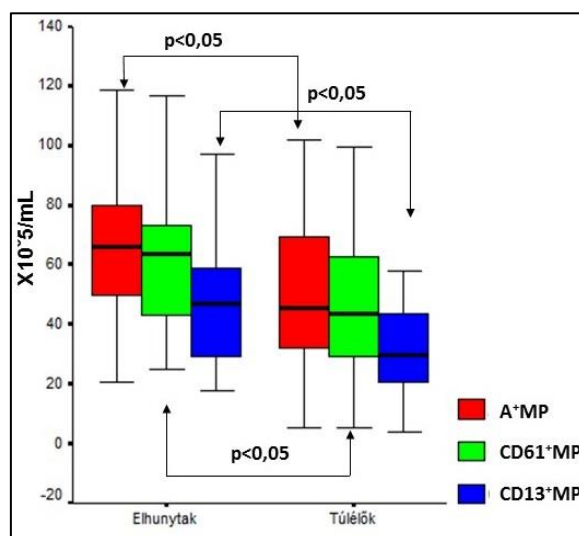
A statisztikai analízishez az SPSS 22 program Windows software-hez kifejlesztett változatát használtuk. A betegcsoportok összehasonlításához Mann-Whitney U- tesztet alkalmaztunk. A korreláció analízis Spearman's rho segítségével történt. ROC analízissel kerestük a túlélés prediktorait a MP-ok között. Független prediktorok kereséséhez „binary logistic regression” analízist használtunk. Az adatokat, mint medián és interquartilis tartomány adtuk meg. A számításokban szignifikánsnak tekintettük a $p < 0,05$ értéket.

4.2.2.2.b. Eredmények

Teljes COPD populáció halálozás 7 éve alatt

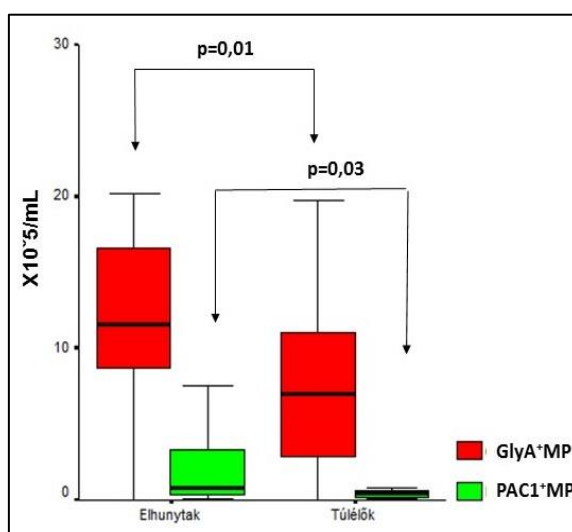
Megvizsgáltuk a 7 évvel ezelőtt mért MP mennyiségek és a túlélés közötti összefüggést a teljes COPD-s betegcsoportban. Azt találtuk, hogy az elhalálozottakban (n=20), a szisztémás keringésben 7 évvel ezelőtt mért össz MP szám, a trombocita eredetű CD61⁺

és a leukocita eredetű CD13⁺ mikropartikulum szám szignifikánsan magasabb volt a túlélőkhöz képest (**21. Ábra**).



21. Ábra. A mért össz MP, CD61⁺ és CD13⁺ mikropartikulum mennyiségek és a 7 éves túlélés a teljes COPD-s betegcsoportban (median és IQR, p<0,05).

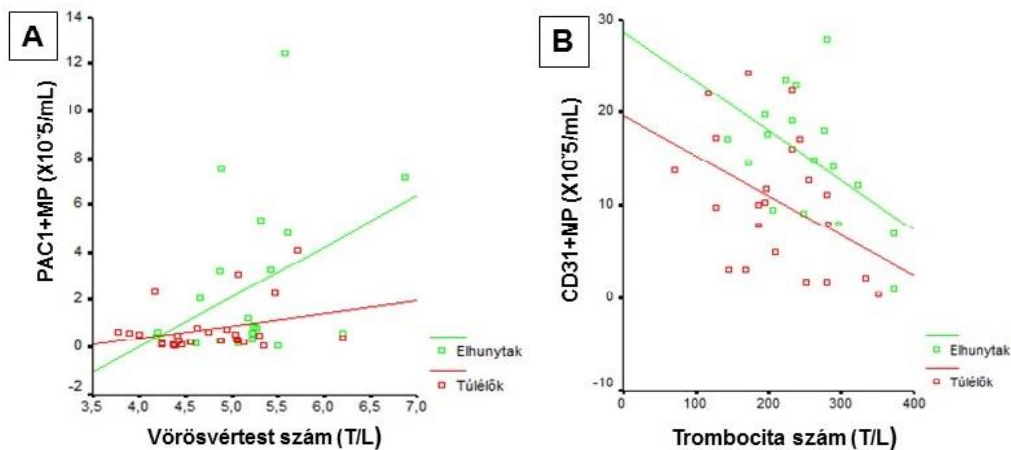
A fent leírt MP számok mellett a vörösvértest eredetű GlyA⁺ és a trombocita eredetű PAC1⁺ (aktivációs marker) MP szám is szignifikánsan magasabb volt a nem túlélőkben a túlélőkhöz viszonyítva a teljes COPD-s betegcsoportban (**22. Ábra**). Érdekes módon 2010-ben, amikor GOLD stádium alapján vizsgáltuk a mikropartikulum mennyiségeket, egy mikropartikulum esetében mutattunk ki különbséget. A PAC1⁺ MP-ok száma szignifikánsan magasabb volt a súlyosabb COPD-ben (GOLD III-IV) szenvedőkben, mint GOLD I-II stádium esetén (p=0,031) (**20. Ábra**).



22. Ábra. A mért GlyA⁺ és a PAC1⁺ mikropartikulum szám és a 7 éves túlélés a teljes COPD-s betegcsoportban (median és IQR, p=0,01; p=0,03).

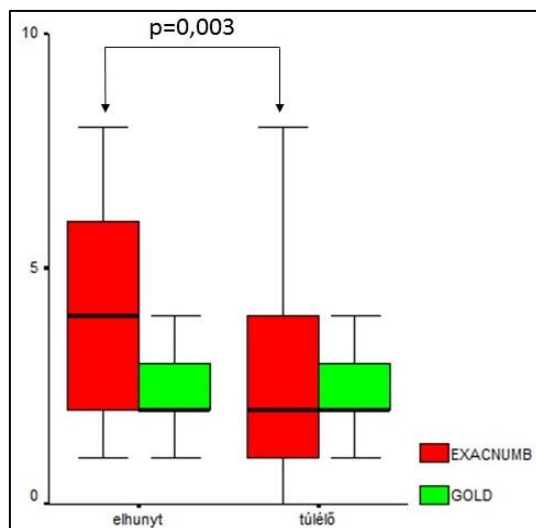
Többszörös regressziós analízist végeztünk, melybe az életkor, nem, FEV1/FVC, a CRP, LABA, LAMA, vörösvértest szám, az össz MP szám valamint a CD61⁺, CD13⁺, PAC1⁺ és a GlyA⁺ MP szám kerültek bevonásra. Ennek alapján a vörösvértest szám (OR: 5,3, 95%CI: 1,009-28,324, p<0,05) és a vörösvértest eredetű GlyA⁺ mikropartikulum szám (OR: 1,2, 95%CI:1,001-1,527, p<0,05) a 7 éves mortalitás független prediktorának bizonyult.

Korrelációs analízissel vizsgáltuk, hogy a perifériás vérben lévő alakos elemek száma befolyásolja-e a MP-ok számát. A PAC1⁺ MP mennyiség és a vörösvértest szám között az elhunytak körében pozitív korrelációt (0,317, p=0,03) míg a trombocita szám és a CD31⁺ MP-ok száma között fordított korrelációt találtunk (-0,485, p<0,05) (23. Ábra – A, B).



23. Ábra. A. A PAC1⁺ mikropartikulum szám és a vörösvértest szám közötti összefüggés a teljes COPD-s betegcsoportban az elhunytak és a túlélők körében. **B.** A CD31⁺ mikropartikulum szám és a trombocita szám közötti összefüggés a teljes COPD-s betegcsoportban az elhunytak és a túlélők körében.

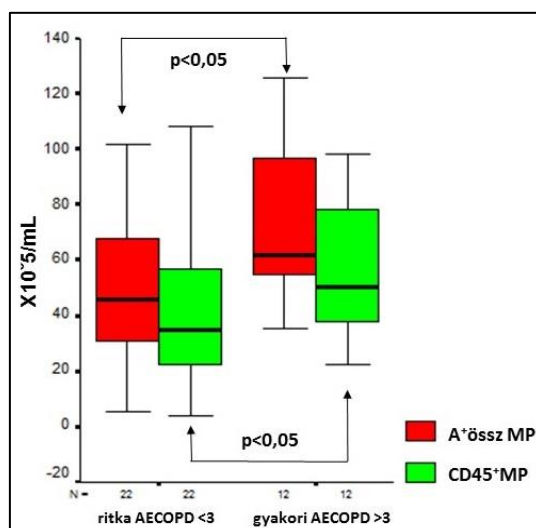
Retrospektíven vizsgáltuk, hogy a túlélő és az elhalálozott betegcsoport között volt-e különbség a COPD-s betegek GOLD stádium szerinti súlyosságában 7 évvel ezelőtt, illetve az azóta eltelt időben kialakult exacerbációk számában. Eredményeink szerint az elhalálozottakban szignifikánsan magasabb volt az exacerbációk száma 7 év alatt, viszont a 7 évvel ezelőtti FEV1 besoroláson alapuló GOLD stádiumban még nem volt különbség a két csoport között (24. Ábra).



24. Ábra. Az exacerbációk száma és a GOLD stádium a túlőkben és a nem túlélőkben a teljes COPD-s betegcsoportban (exac numb= exacerbációk száma). Medián, 25-75 percentilis.

Stabil COPD populáció exacerbációjának markerei

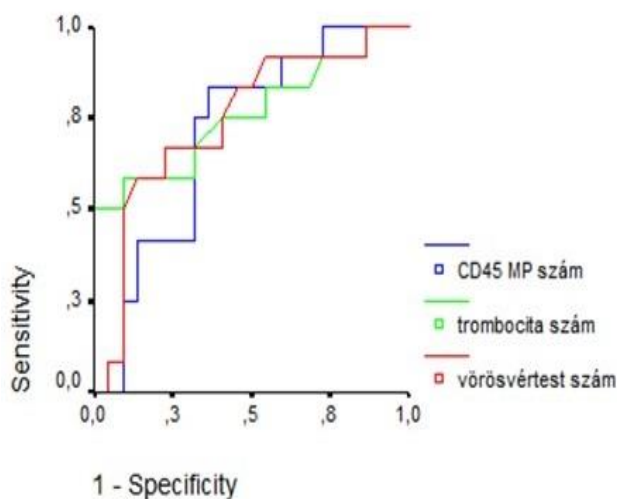
Ezt követően olyan mikropartikulumokat kerestünk, melyek a stabil COPD-s betegekben (n=34) előre jelezhetik a gyakori exacerbációt (>3/év). Eredményeink szerint a gyakori exacerbációt mutató betegeknél az össz MP és a pán leukocita eredetű CD45⁺ MP szám szignifikánsan magasabb volt, mint a ritka (<3/év) exacerbációt mutató betegeknél (p<0,05) (25. Ábra).



25. Ábra. A mért össz MP és a CD45⁺ mikropartikulum mennyiségek a stabil COPD-s betegcsoportban a ritka (<3/év) és a gyakori (>3/év) exacerbációt mutató betegek esetében (median és IQR, p<0,05).

ROC analízist végeztünk a MP számok és a keringésben lévő alakos elemek gyakori exacerbációt előrejelző értékének megítélésére a stabil COPD-s populációban. A

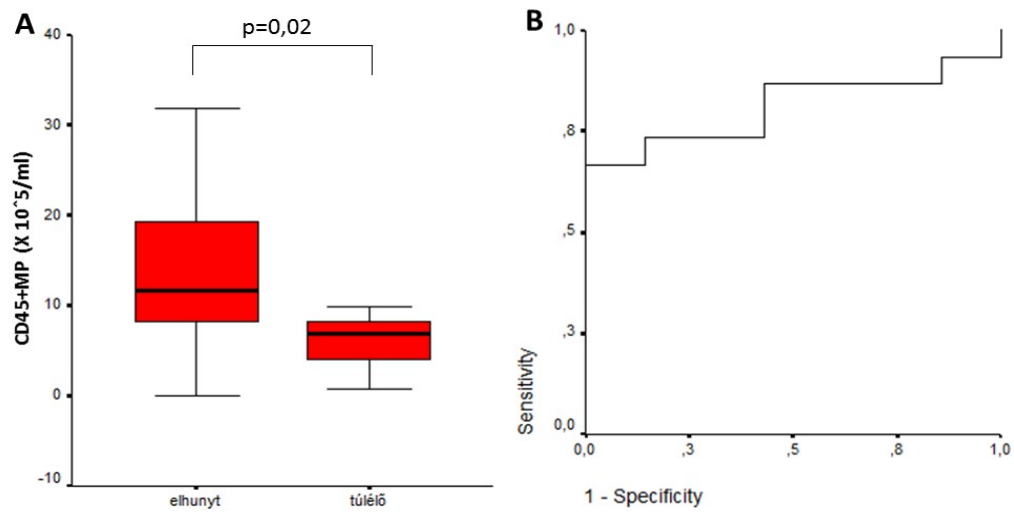
gyakori exacerbációkat a pán leukocita eredetű CD45⁺ MP szám (Area: 0,708, 95%CI: 0,532-0,888, p=0,047), a vörörvértest szám (Area:0,744, 95%CI: 0,566-0,922, p=0,020), és a trombocita szám (Area: 0,759, 95%CI: 0,574-0,941, p=0,014) jelezte leginkább előre (**26. Ábra**). Többszörös regressziós analízissel független prediktort azonban nem találtunk.



26. Ábra. A gyakori exacerbációk (>3/év) előrejelzésére alkalmas mikropartikulomok és alakos elemek (ROC analízis).

Gyakori exacerbáció és a túlélés

Ezt követően olyan mikropartikulumokat kerestünk, melyek a gyakori exacerbációt (exac numb> 3/év) mutató betegekben a 7 éves megfigyelési időszakban a túlélés független prediktorai voltak. ROC analízis alapján, a CD45⁺ mikropartikulumok $\leq 8,5 \times 10^5$ /mL értéknél a túlélést 73%-os szenzitivitással és 86%-os specificitással jelezte előre (Area: 0,81, 95%CI: 0,63-0,99, p=0,02) (**27. Ábra – A, B**). Többszörös regressziós analízissel, melybe az életkor, nem, FEV1/FVC, CRP és CD45⁺ MP kerültek bevonásra, csak a CD45⁺ mikropartikulum szám mutatkozott a túlélés független prediktorának (OR: 0,75, 95%CI: 0,55-1,00, p=0,05).



27. Ábra. A mért CD45⁺ mikropartikulum szám és a 7 éves túlélés a gyakori exacerbációt mutató COPD alcsoportban (A) és a marker ROC görbéje (B) (Area: 0,81, 95% CI: 0,63-0,99, p=0,02).

5. Megbeszélés, a vizsgálati eredmények értékelése

5.1. Kontroll csoport, referencia tartomány

Az irodalomban viszonylag kevés adat található a plazmában mérhető MP mennyiségek referencia tartományának meghatározására. A legtöbb esetben a vizsgálni kívánt beteganyaghoz alakítanak ki viszonylag kisszámú korban megfelelő kontroll csoportot. Ezek az eredmények nehezen összehasonlíthatóak a különböző minta előkészítés (friss 1 órán belül feldolgozott vagy -80°C -on tárolt minta, centrifugálási idő, centrifugális erő), mérési és kapuzási technikák, a mikropartikulumok sejteredetének megállapítására használt CD markerek miatt. A mértékegységek használata sem egységes. A legelterjedtebbek: MP szám $\times 10^5/\text{ml}$, MP szám $\times 10^6/\text{L}$, MP szám μl^{-1} , MP%. Az újonnan piacra került áramlási citométerek (Beckman Coulter GalliosTM, Apogee A50 Micro) csak bonyolítják a helyzetet, mivel ezek már alkalmasak a $0,5 \mu\text{m}$ alatti méretkapuban ($0,2\mu\text{m}$ -ig) elkülöníteni a mikropartikulumokat a háttérzajtól. A teljesség igénye nélkül néhány kiragadott példán keresztül mutatom be az irodalomban található sokszínűséget a MP-ok referencia tartományának tekintetében.

Berkmans kutatócsoportja 15 egészséges férfi (kor nincs megadva) frissen feldolgozott vérmintájából határozta meg a trombocita ($237 \times 10^6/\text{L}$; 116-565), vörösvértest ($28 \times 10^6/\text{L}$; 13-46), granulocita ($46 \times 10^6/\text{L}$; 16-94) és endotél ($64 \times 10^6/\text{L}$; 16-136) eredetű mikropartikulumok számát. A mintákat $1500 \times g$ -vel centrifugálták 20 percet, majd a felülúszóból $250 \mu\text{l}$ -t centrifugáltak $17.570 \times g$ -vel 30 percig. A MP pelletről $225 \mu\text{l}$ felülúszót eltávolítottak, a pelletet reszuszpendálták és $225 \mu\text{l}$ PBS rámerése után újra centrifugálták $17.570 \times g$ -vel 30 percig. A pelletről újra eltávolítottak $225 \mu\text{l}$ felülúszót, a maradék $25 \mu\text{l}$ PBS-ben reszuszpendálták a pelletet és a mérésekhez ezt használták fel. A trombocita eredetű MP-ok detektálására CD61, a vörösvértest eredetűek esetén Glycophorin A, granulocita markerként CD45 és CD14, míg endotél markerként CD62E-t használtak. A méréseket FACScan áramlási citométeren végezték. A MP-ok háttérzajtól való elkülönítésére FSC és SSC kapuzáson kívül, AnnexinV-el való festődésüket használták fel. Az AnnexinV pozitív MP-ok azonosításához szükséges küszöb létrehozásához jelöletlen MP-t használtak, mely az autofluoreszcencia

korrigálására is szolgált. A mintákat 1 percre mérték, mely idő alatt kb. 150 µl jelölt MP szuszpenziót analizáltak. A MP számot egy képlet segítségével adták meg [158].

Egy másik kutatócsoport 60 egészséges önként jelentkező (nemek közötti megoszlás 1:1) 26-68 év közötti egyén esetében határozta meg az AnnexinV és CD41 pozitív trombocita eredetű MP-ok referencia tartományát. A mintákat levétel után 2-4 órán belül centrifugálták (1500Xg, 15 perc; 13000Xg, 2 perc) majd -80°C-on tárolták feldolgozásig. A méréseket Beckman Coulter FC500 áramlási citométeren végezték a 0,5-1,0 µm közötti méretkaput használva. Eredményeik: a trombocita eredetű MP szám átlaga 1350±1089 MP/µL⁻¹, nők esetében 1775/µL⁻¹ (1014-3039, 1-3 quartilis), férfiaknál pedig 656/µL⁻¹ (407-962, 1-3 quartilis) [152].

Nielsen és munkatársai 24 egészséges egyén (Nő 15; Férfi 9) esetében határozta meg a plazmában található MP szubpopulációk számát (trombocita, monocita, vörösvértest és endotél sejt). A mintákat egy órával a mintavétel után centrifugálták (1800Xg 10 perc, 3000Xg 15 perc, 3000Xg 5 perc) majd -80°C-on tárolták feldolgozásig. A méréseket BDFACS Aria™ III High Speed Cell Sorter készüléken végezték, párhuzamos összehasonlítással Beckman Coulter F500-as áramlási citométerrel. Méretkapu tekintetében a felső határt a 0,9 µm, alsó határként pedig a 0,2 µm-et határozták meg. Azonban a túl nagy háttérzaj miatt az FC500-on ezt a tartományt feljebb kellett vinni a 0,5 µm alsó határáig. A PS kimutatásra AnnexinV helyett Lactadherint használtak. Eredményeik szerint a FACS Aria III citométerrel 6-szor több össz MP-ot és 4-szer több trombocita eredetű MP-ot sikerült kimutatniuk az FC500 készülékhez képest. Az általuk mért eredményeket a teljes vizsgálati csoportban és nők/férfiak tekintetében medián, interquartilis tartományban kifejezve a **15. Táblázat** mutatja be.

15. Táblázat: Nielsen és munkatársai eredményei.

CD marker	Kontroll csoport		Nők		Férfiak	
	Medián MP szám μl^{-1}	Interkvartilis	Medián MP szám μl^{-1}	Interkvartilis	Medián MP szám μl^{-1}	Interkvartilis
Lactadherin ⁺ össz MP	15711	10462-42649	12463	9236-17543	41538	18825-70659
Trombocita CD41 ⁺	2304	1419-2777	1835	1384-2876	2137	2020-2475
Monocita CD14	6	3-10	4	2-6	11	7-12
Endotél CD31/CD42b	179	120-246	149	119-218	254	202-297
Vörösvértest CD235a	217	152-293	202	101-269	251	179-721

Nők vs férfiak tekintetében minden vizsgált különböző sejteredetű markerrel a férfiak esetén magasabb MP számot találtak [159].

Gustavson és munkatársai 20-70 év közötti 82 nő és 62 férfi esetében vizsgálta a különböző sejteredetű MP számokat, referencia taromány kialakítása céljából. Méréseikhez hirudinnal alvadásgátolt teljes vér centrifugálása (2szer 3000Xg 15 perc) után nyert, mintavétel után 30 percen belül feldogozott trombocita mentes plazmát használtak. A plazmákat mérésig -80°C -on tárolták. Jelölés előtt a felolvasztott mintákat 20.000Xg-vel 30 percig üleptették. A méréseket FACSCanto™ digitális áramlási citométeren végezték a 0,2-1,0 μm közötti méretkapuban. Eredményeik a **16.Táblázatban**.

16. Táblázat: Gustavson és munkatársai eredményei.

CD marker	Nők		Férfiak	
	Medián MP szám μl^{-1}	25-75%-os percentilis	Medián MP szám μl^{-1}	25-75%-os percentilis
Annexin V ⁺ MP	921	439-1,443	660	466-1,002
Trombocita CD42a ⁺	626	293-1,156	486	342-868
Monocita CD14 ⁺	12	7-27	11	6-26
Endotél CD62E ⁺	17	9-30	10	4-22
Vvt CD235a ⁺	57	23-107	73	44-124
Pán leukocita CD45 ⁺	23	16-35	23	17-38

Méréseik alapján a vörösvértest és leukocita eredetű MP-ok kivételével a többi sejteredetű MP szám a nők esetében magasabb volt, mint a férfiaknál [160].

5.2. Szeptikus betegcsoport

A szeptikus betegcsoportban mért eredményeket összevetettük az irodalomban található adatokkal. Mostefai és munkatársai 36 szeptikus sokkban lévő beteg esetében vizsgálta többek között a keringésben lévő MP-ok számát és összetételét 18 nem szeptikus beteg

mintáival összehasonlítva. Eredményeik szerint, az össz MP szám szignifikáns emelkedést mutatott a szeptikus beteg csoportban, ezen belül is a trombocita (CD41) és endotél (CD146, CD62L, CD62P) eredetű MP szám emelkedett jelentősen. A leukocita eredetű (CD45) MP szám, pedig szignifikáns csökkenést mutatott. A granulocita (CD66b), monocita (CD11b) és vörösvértest (CD235a) eredetű MP-ok tekintetében szignifikáns különbséget nem tudtak kimutatni a két betegcsoport között [125].

Nieuwland és munkatársai 7 meningococcus eredetű szeptikus sokk-ban szenvedő beteg és 5 egészséges egyén esetében mérték a különböző eredetű MP számokat. A betegeket a szeptikus sokk tüneteinek és jeleinek megjelenése utáni első 24 órában választották be, akiknek pozitív *Neisseria meningitidis* hemokultúra eredményük volt. Eredményeik szerint a trombocita (CD61) és granulocita (CD66b) eredetű MP szám szignifikáns emelkedést mutatott a szeptikus betegcsoportban. Az endotél (CD62E), a monocita (CD14) és a B sejt (CD20) eredetű MP szám is jelentős, de nem szignifikáns emelkedést mutatott a szeptikus betegek esetében [120].

Joop és munkatársai összesen 9 többszervi elégtelenségben szenvedő (3 vagy több, legalább 1 napja fennálló) szeptikus beteg, valamint 14 egészséges kontroll esetében vizsgálták a különböző eredetű MP mennyiségeket. Eredményeik szerint a fenti két irodalmi adattal és a mi mérési eredményeinkkel ellentétben a trombocita (CD61) és endotél (CD62E) eredetű MP szám szignifikáns csökkenését tapasztalták a szeptikus betegcsoportban. CD144 (VE-cadherin) jelölést használva az endotél eredetű MP-ok száma a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan nem változott. Hasonló a helyzet a vörösvértest eredetű MP-ok (CD235a) esetében is, míg a granulocita eredetű MP-ok mennyisége (CD66b) a szeptikus betegcsoportban szignifikánsan emelkedett a kontroll csoporthoz képest [121].

Soriano és munkatársai 35 súlyos szepszisben szenvedő beteg esetében vizsgálták a besorolást követő (a betegeket 24-48 órával az első szepszis indukálta szervi elégtelenség megjelenése után sorolták be) 1., 2. és 3. napon a trombocita (CD31⁺/CD42⁺), az endotél (CD31⁺/CD42⁻) és leukocita (CD11b) aktivációs markereket. Kontrollként 45 egészséges egyén mintáját használták fel. Eredményeik szerint a szeptikus betegekben mért endotél és leukocita eredetű markerek szignifikáns emelkedést mutattak a kontroll csoporthoz képest. A túlélők esetében szignifikánsan

emelkedett endotél eredetű MP és CD11b leukocita aktivációs markerrel pozitív MP számot találtak a nem túlélőkhöz viszonyítva. A trombocita eredetű MP szám is magasabb volt a túlélőkben, azonban ez nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak [122].

5.3. COPD-s betegcsoport, prospektív és retrospektív vizsgálat

A COPD-re a helyi pulmonális gyulladáson kívül jellemző a szisztémás gyulladás jelenléte, mely egyben fontos meghatározója az ateroszklerózisnak is [161,162]. Irodalmi adatokból az is ismert, hogy ez a szisztémás gyulladás megmagyarázhatja a COPD-s betegek fokozott kardiovaszkuláris rizikóját [163,164], ami teljes egészében nem magyarázható meg a dohányzással [165,166]. Az endotél károsodás, tehát nemcsak a tüdőerekben, hanem a szisztémás erekben is megjelenik. A gyulladással és a véralvadási rendszerek között a szervezetben széleskörű párbeszéd létezik. Az egyik működési zavara maga után vonja a másikat [167].

A két rendszer közötti együttműködésben a fő szereplők a trombociták. Fontos immun feladatot töltenek be és kölcsönhatásba tudnak lépni mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszerrel [168,169]. A trombociták képesek kötődni a monocitákhoz trombocita-monocita komplexet hozva létre, de elindíthatják a monociták és a limfociták aktivációját is, így növelve az immunválaszt [170]. A COPD-s betegek körében végzett eddigi kutatások elsősorban az endotél eredetű mikropartikulumokat (EMP) vizsgálták, holott a betegség kialakulásában és lefolyásában a keringésben található más sejtekről származó MP-ok is fontos szerepet játszhatnak [171,172,173]. Ismert, hogy a COPD kialakulásában és progressziójában a trombociták és monociták is szerepet játszanak [174].

Az irodalomban COPD-s betegek körében végzett MP vizsgálatokról először Takahashi és munkatársai számoltak be. 80 stabil és 27 exacerbációban lévő COPD-s beteg endotél eredetű mikropartikulum (EMP) számát vizsgálták 20 egészséges kontrollhoz viszonyítva. Vizsgálataikból a kardiovaszkuláris társbetegséggel szövődött betegeket kizárták. Markerek tekintetében négy fenotípust határoztak meg: CD144⁺ VE-cadherin, CD31⁺/CD41⁻ PECAM, CD146⁺ MCAM és CD62E⁺ E-szelektin pozitív endotél eredetű MP-ok. Eredményeik szerint a COPD-s betegcsoportban szignifikánsan emelkedett

CD144⁺, CD31⁺/CD41⁻ és CD62E pozitív EMP számot találtak a kontroll csoporthoz viszonyítva. A CD146⁺ endotél eredetű MP-ok tekintetében nem találtak szignifikáns különbséget a vizsgált két csoportban. Az exacerbációban lévő COPD-s betegcsoportban is szignifikánsan emelkedett CD144⁺, CD31⁺/CD41⁻ és CD62E⁺ endotél eredetű MP számot mutattak ki a stabil COPD-s betegekhez viszonyítva. A szerzők a foszfatidilszerin expozíciót nem vizsgálták a MP-ok felszínén [171]. Eredményeinket összehasonlítva a CD62E⁺ EMP szintjében mi is magasabb értékeket mértünk exacerbációban a stabil COPD-s betegekhez képest, a CD31⁺ endotél MP szám tekintetében viszont nem találtunk szignifikáns különbséget. Szignifikáns különbséget mutattunk ki viszont a trombocita eredetű CD41⁺ és CD42a⁺ MP szám tekintetében az AECOPD-s betegcsoportban a stabil COPD-s betegcsoporthoz képest. Méréseink szerint a monocita eredetű CD14⁺ (LPS receptor) MP szám is szignifikánsan magasabb értéket mutatott az exacerbációban lévő betegeknél.

Thomashow és munkatársai (MESA csoport: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Chronic Obstructive Pulmonary Disease Study) a keringő endoteliális MP-ok mennyiségét vizsgálták kardiovaszkularis társbetegség nélküli, 10 csomag/év vagy annál több dohányzási szokással rendelkező, stabil COPD-s betegcsoportban (n=104) valamint kontrolloknál (n=79). A COPD-s betegeket enyhe (n=39), középsúlyos (n=46) és súlyos (n=19) csoportra osztották. Endotél markerek tekintetében a CD31⁺/CD42b⁻ (PECAM), CD51⁺/CD42b⁻ (vitronectin receptor) és a CD62E⁺ (E-szelektin) EMP-k számát vizsgálták. A MP-ok felszíni foszfatidilszerin expozícióját ők sem vizsgálták. Eredményeik szerint szignifikánsan emelkedett CD31⁺ EMP számot találtak a súlyos és a középsúlyos COPD-s betegek esetén a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezzel szemben csak a súlyos COPD-s betegcsoportban mértek szignifikánsan emelkedett CD62E⁺ EMP számot a kontroll csoporthoz képest. CD51⁺ mikropartikulum szám tekintetében nem találtak szignifikáns különbséget a kontroll és a betegcsoport között [172].

Takhashi és mtársai egy később megjelent munkájukban az EMP szám és az éves 1. mp.-ben erőltetett kilégzés közben mért térfogat változásai közti összefüggést vizsgálták COPD-s betegekben. Vizsgálataikba 48 stabil COPD-s beteget vontak be (a kardiovaszkuláris betegségben szenvedő és dohányzó betegeket kizárták). Az EMP

szubttípusokat az alábbi markerek jelölésével határozták meg CD144⁺ (VE-cadherin EMP), CD31⁺/CD41⁻ (PECAM EMP) és CD62E⁺ (E-szelektin EMP). Szignifikáns negatív korrelációt találtak az E-szelektin és VE-cadherin pozitív EMP szám és az éves FEV1 változás között. Többváltozós lineáris regressziós analízist alkalmazva kimutatták, hogy az E-szelektin pozitív EMP szám, függetlenül a VE-cadherin MP számtól az egyetlen paraméter, mely összefüggésbe hozható az éves FEV1 változásokkal. ROC görbe alapján megállapították, hogy a gyors FEV1 csökkenését a 153,0/ul cut-off E-szelektin szám jelzi előre. Következtetésük szerint stabil COPD-s betegekben a gyors FEV1 csökkenést a magas E-szelektin pozitív MP szám jelzi előre [175]. Eredményeink alapján a COPD-s betegcsoportunkban CD62E⁺ MP szám mellett fordított korrelációt találtunk még a CD42a⁺ és a CD14⁺ MP mennyiségek valamint az erőltetett kilégzési vitálkapacitás a FEV1/FVC között, ami arra utalhat, hogy a tüdő állapotromlásához a tüdőkapillárisokban található érendotél változáson kívül a trombociták és a monociták is hozzájárulhatnak.

A dohányzás és az endotél eredetű MP szám közti összefüggést Gordon és munkatársai vizsgálták. Vizsgálataikba 92 egyént vontak be, akiket egészséges nem dohányzó, normál tüdőfunkcióval rendelkező egészséges (tünetmentes vagy tünetekkel) dohányzó, normál spirometriával és alacsony DL_{CO}-val (korai tüdőkárosodás jelei) rendelkező egészséges dohányzó csoportba soroltak be. A mikropartikulum fenotípusokat az alábbi CD marker párosításokkal határozták meg: CD42b⁻/CD31⁺ - EMP; CD42b⁻/CD62E⁺ - aktiváció által létrejött EMP; CD42b⁻/CD31⁺ /CD143 – pulmonáris kapillárisból származó EMP (a CD143 = ACE – angiotenzin konvertáló enzim, mely a pulmonáris kapillárisokban található meg nagy mennyiségben); CD42b⁻/CD31⁺ /Annexin V⁺ - apoptózis indukálta EMP. Csökkent CD42b⁻/CD62E⁺/CD42b⁻/CD31⁺ arány esetén apoptózis indukálta, míg emelkedett arány esetén aktiváció indukálta EMP-nek tekintették a mért mikropartikulumokat. Egészséges dohányosokban enyhén emelkedett EMP számot, míg a korai tüdőkárosodással rendelkező dohányosokban jelentősen magasabb EMP számot mértek a nem dohányzókhöz viszonyítva, melyek apoptotikus eredetűek és a tüdőkapillárisokból származnak. Eredményeik szerint az emfizéma kialakulásában szerepet játszó pulmonáris kapilláris sejtek apoptózisát korai stádiumban, a tünetek megjelenése előtt ki lehet mutatni a CD42b⁻/CD31⁺/Annexin V⁺ EMP mérésével [173]. A fenti eredményekkel ellentétben, mi nem találtunk

szignifikáns CD31⁺ EMP szám eltérést a dohányzás tekintetében a COPD-s betegcsoportjainkban, mely magyarázható az eltérő CD marker festéssel (nem használtunk kettős jelölést az EMP meghatározásra és nem szorítkoztunk az ACE pozitív MP-ra) valamint azzal, hogy a betegcsoportokban a COPD diagnózisának megfelelően mindig volt spirometriai eltérés.

Retrospektív vizsgálatainkban a 7 évvel ezelőtt mért különböző sejteredetű MP-ok száma és a betegség kimenetele közti összefüggést vizsgáltuk. Eredményeink szerint COPD-ben az Annexin V⁺ össz, a trombocita (CD61⁺) és a leukocita (CD13⁺) eredetű MP számok is szignifikáns emelkedést mutattak a nem túlélő betegekben. A fent leírt MP számok mellett a vörösvértest eredetű GlyA⁺ és a trombocita eredetű PAC1⁺ aktivációs marker MP szám is szignifikánsan magasabb volt a nem túlélőkben a túlélőkhöz viszonyítva a teljes COPD-s betegcsoportban (**21. Ábra**). A PAC1 csak akkor jelenik meg, a különböző stimulusok hatására (pl. ADP, trombin, TxA2) aktiválódott trombociták felszínén, amikor GPIIb/IIIa receptor konformáció változáson esik át, ezáltal létrehozva egy ligand kötő helyet a fibrinogén, a von Willebrand faktor, a fibronektin és a vitronektin számára. A trombociták egymáshoz kapcsolódása (aggregáció) a primér hemosztázis folyamatában a GPIIb/IIIa receptor és a fent felsorolt ligandok közvetítésével megy végbe. Érdekes módon 2010-ben, amikor GOLD stádium alapján vizsgáltuk a mikropartikulum mennyiségeket a PAC1⁺ MP-ok számában szignifikáns emelkedést mutattunk ki a súlyosabb COPD-ben (GOLD III-IV) szenvedőkben, mint GOLD I-II stádium esetén ($p < 0,031$). A CD61 a fent említett receptor egyik alegysége (integrin $\beta 3$ -lánc). Eredményeink azt sugallják, hogy a súlyosabb GOLD stádiumú betegek trombocitái aktivált állapotban vannak és a trombo-inflammatorikus molekulák számának emelkedése meghatározza a klinikai kimenetelt. Mivel MP-ra vonatkozóan korábbi publikációt nem találtunk, ezért eredményeink mindenképpen újdonságnak tekinthetők.

A COPD és a trombociták aktiváltsága közötti összefüggést több kutatócsoport is vizsgálta. Muñoz-Esquerre és mtsai a trombociták reaktivitását vizsgálták VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) fehérje foszforiláltságának mérésével valamint impedanciás és optikai aggregometriával, akut exacerbációban lévő COPD-s betegekben, ill. a stabil állapotba való visszatérésükkor. Vizsgálataikba a trombocita

aggregáció gátló terápián lévő betegeket is bevonták. Eredményeik szerint a trombociták reaktivitása a betegség akut exacerbációjában megnő, ami az aggregáció gátló terápián lévő betegek esetében is igazolható. Azok a betegek, akiknek a gyulladáshoz kapcsolódó markerei nagyobb emelkedést mutattak AECOPD-ben, nagyobb valószínűséggel mutattak trombocita reaktivitás emelkedést [176]. Aleva és munkacsoportja számolt be arról, hogy stabil COPD-s betegek (GOLD II-IV) trombocitái ADP és TRAP (trombin receptor aktiváló peptid) agonistákkal való stimulálás után fokozott fibrinogén kötődést mutattak az aktivált GPIIb/IIIa receptorhoz, felszínükön a P-szelektin expresszió fokozódása nélkül. A trombociták reaktivitása és a tüdőfunkciós paraméterek között nem találtak összefüggést [177].

Két szerző is leírja, hogy COPD-s betegekben kimutatható a trombocita-monocita aggregátumok jelenléte a keringésben, melyek a trombocita aktiváció egyik markerének tekinthetők. Aleva és mtsai 30 stabil COPD-s beteg teljes vérmintáiban talált szignifikáns trombocita-monocita aggregátum emelkedést áramlási citometriával, CD61 és CD14 markerek vizsgálatával, a trombociták reaktivitásának emelkedése nélkül [178]. Maclay és mtsai a trombocita-monocita aggregátumokat CD42a és CD14 jelöléssel szintén áramlási citometriával vizsgálta, stabil és exacerbációban lévő COPD-s betegekben. Az aktiváció hatására a trombociták felszínén megjelenő P-szelektin mennyiségét is mérték. A stabil COPD-s betegek esetén a trombocita-monocita aggregátumok szignifikáns emelkedést mutatottak a kontrollhoz képest, és mennyiségük tovább emelkedett akut exacerbációban lévő betegeknél. Szignifikáns trombocita aktiválódást a trombociták felszínén mért P-szelektin expresszióval nem tudtak kimutatni [179]. A trombocita-monocita kölcsönhatás a szerzők szerint nem P-szelektin dependens, hanem egy új mechanizmus lehetőségét veti fel. A COPD, az egyéb gyulladás és a kardiovaszkuláris betegségek patomechanizmusa között a trombocita-monocita interakció lehet az egyik közös pont. Prospektív eredményeink szerint a monocita eredtű CD14⁺ és a trombocita eredetű CD41⁺ és CD42⁺ MP szám az akut exacerbációban szignifikáns különbséget mutatott a stabil COPD-s beteg populációhoz képest ($p=0,008$, $0,018$ ill. $0,002$) ami arra utalhat, hogy a COPD lefolyásában, az exacerbációk kialakulásában a trombocita-monocita kölcsönhatásnak fontos szerepe lehet. A trombociták aktiválódásuk után komplexet képeznek a monocitákkal, ezek a komplexek pedig az aterotrombózis és a gyulladás kialakulásában játszhatnak szerepet.

Az akut exacerbációkban megjelenő szisztémás gyulladás fontos szerepet játszhat a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában.

Betegeink utánkövetése során a trombocita (CD61⁺) és az aktivációs trombocita (PAC1⁺), a leukocita (CD13⁺) valamint vörösvértest (GlyA⁺) eredetű MP valamint a vörösvértest szám mutatott szignifikáns emelkedést a nem túlélő betegekben. Ez utóbbi kettő független prediktornak bizonyult. A COPD patofiziológiájában a vörösvértestek szerepe kevésbé tisztázott. A klasszikus felfogás szerint a betegségben fellépő hipoxia miatt a legáltalánosabb mellékhatás a policitémia. Napjainkban azonban a hosszú távú otthon is alkalmazható oxigén terápia hozzáférhetőségével a hipoxia jól korrigálható, ezért épp ellenkezőleg ezeknél a betegeknél egyre gyakrabban írnak le anémiát [180]. A policitémia vagy az anémia kialakulása a hipoxiás és a gyulladásos stimulusok közötti egyensúlytól függ. A legtöbb irodalmi adat szerint a COPD-ben az anémia kialakulásának fő oka a betegségben fennálló szisztémás krónikus gyulladás [181]. A betegség lefolyása során a vörösvértestek mechanikai tulajdonságai is változnak. A nyírófeszültség emelkedésével, mely a MP képződés egyik elindítója az exacerbációban lévő betegeknél a vörösvértestek deformabilitása csökken, aggregációja pedig nő. Ezek a változások oxidatív stressz hatására is végbemehetnek tovább rontva a szövetek oxigenizációját [182]. Straface és munkatársai analitikai citológiával és morfometriai módszerekkel vizsgálták a vörösvértest eltéréseket stabil, súlyos és közepsúlyos COPD-s betegekben. Ezeknél a betegeknél a kontrollokhöz viszonyítva szignifikánsan nagyobb számban volt kimutatható kupa-alakú vörösvértest és acantocita. A citoskeleton fehérjéi, elsősorban a spektrin filamentumok lokalizációja is megváltozott, a Glycophorin A expresszió, pedig csökkent a vörösvértestek felszínén. A fent leírtak arra utalhatnak, hogy a COPD-ben nagy számban jelen lévő makrofágok által felszabadított ROS-nak szerepe lehet a vörösvértestek alaki és funkcionális elváltozásaiban. Egyre több bizonyíték kerül elő arra nézve is, hogy a vörösvértestek jelátviteli sejtként is működhetnek, a más sejtekkel történő biokémiai kölcsönhatások szabályozásában [183,184].

Lacedonia és mtsai. írtak le súlyos és közepsúlyos stabil COPD-s betegek indukált köpetében emelkedett GlyA⁺ mikropartikulum számot, mely negatívan korrelált a testtömeg index-el és pozitívan a dyspnea index-el [185]. Mi elsőként írtuk le a vörösvértest eredetű GlyA⁺ MP szám emelkedést COPD-s betegek keringésében. A

stabil és az exacerbációban lévő betegek esetében mennyiségükben nem találtunk szignifikáns különbséget. Retrospektív vizsgálataink szerint viszont az akut exacerbációban lévő al csoportban a keringésben mért MP mennyiségek közül a 7 év alatt elhalálozottakban a trombocita eredetű MP-ok mellett a vörösvértest eredetű GlyA⁺ MP száma szignifikánsan magasabb volt a túlélőkhöz képest, mely független prediktornak bizonyult.

A betegségben a gyakori exacerbációk előrejelzésére az Annexin V⁺ össz MP szám mellett a pán leukocita eredetű CD45⁺ MP szám mutatkozott a legalkalmasabbnak, azonban nem bizonyult független prediktornak. Retrospektív vizsgálatunkban a ROC analízis alapján, a CD45⁺ mikropartikulum szám $\leq 8,5 \times 10^5$ /mL cut off értéknél a gyakori exacerbációt mutató betegeknél a túlélést 73%-os szenzitivitással és 86%-os specificitással jelezte előre. A CD45 egy fehérje tirozin foszfataz (leukocyte common antigen LCA), mely megtalálható a keringésben lévő sejtek felszínén, kivéve a vörösvértesteket és a trombocitákat. A T és B sejt antigén receptor által közvetített aktiváció alapvető szabályozója. A COPD-ben leírt krónikus gyulladásra jellemző a neutrofil granulociták, a makrofágok, a B sejtek, a limfocita aggregátumok és a CD8⁺ T sejtek felszaporodása főleg a kis légutakban [186]. A gyulladás mértéke a betegség GOLD stádium szerinti súlyosságával párhuzamosan nő [187]. Ezeknek a sejteknek az in vivo vizsgálata nehézségbe ütközik. Retamales és munkatársai vizsgálták először súlyos COPD miatt tüdő térfogat csökkentő műtéten (lung volume reduction surgery) átesett betegeknél a tüdő alveolusok falában és az alveolusok közötti térben a polimorfonukleáris sejtek (PMN), a makrofágok, a B sejtek, a CD4⁺, CD8⁺ limfociták és eozinofilek számát [188]. Eredményeik szerint a dohányzás talaján kialakult súlyos emfizéma a gyulladásos sejtek abszolút számának emelkedésével (kivéve a B limfocitákat) járt együtt. Turato és munkatársai dohányzó, súlyos COPD-s betegek sebészeti anyagában vizsgálták a kis légutak és a muskuláris pulmonáris artériák szerkezeti elváltozásait valamint a gyulladásos sejtek jelenlétét és eloszlását. A kis légutakban emelkedett CD45⁺ össz leukocita számot mutattak ki, mely negatív korrelációt mutatott a FEV1-el. A légutak falában a gyulladás a CD8⁺ és CD4⁺ limfociták számának emelkedésével, a légutak epitéliumában pedig a makrofágok számának emelkedésével volt jellemezhető. A pulmonáris artériák szintjén nem tudtak eltérést kimutatni [189].

COPD-s betegek köpetében is kimutathatók a gyulladásozó sejtek. A köpetben a neutrofil granulociták találhatóak a legnagyobb számban, melyek aktivált formában proteázokat, mieloperoxidáz és elasztáz termelnek [190]. A neutrofilek száma és a FEV1 között negatív korreláció mutatható ki [191]. A COPD-s betegek 1/3-nak köpetében emelkedett eozinofil szám mutatható ki. Érdekes módon ezek a betegek jól reagálnak a szteroid kezelésre [192]. A második legnagyobb számban jelenlévő sejt a köpetben, a makrofág. Ezek metalloproteinázokat termelnek, melyek a tüdőszövet átalakításában és a következményes légút obstrukcióban van szerepe. Ezenkívül reaktív oxigén gyökök (ROS) és lipid mediátorok (leukotriének, citokinek, kemokinek) kibocsátására is képesek [193]. A limfociták viszonylag kis számban mutathatók ki, közülük a CD8⁺ citotoxikus T limfocita populáció a legszámasabb. Szerepük a COPD kialakulásában nem tisztázott. A tüdő parenchima sejtjeinek károsodása valószínűleg az általuk felszabadított perforin és granzim által jön létre [194]. Kis számban az aktivált CD4⁺ T limfociták is jelen vannak a COPD-s betegek köpetében, ezek elsősorban Th1 típusúak, melyek CXCL10 típusú kemokinek expresszálása révén ellenőrizhetik a matrix metalloproteinázok felszabadítását [195]. A broncho-alveoláris mosófolyadékban (BALF) főleg makrofágok, kisebb számban neutrofilek és limfociták mutathatók ki. Ennek magyarázata, hogy a köpet elsősorban a nagy légutakból származik, míg a BALF a bronhiolusokból és az alveolusokból [196].

Lacedonia és mtsai. súlyos és közepsúlyos stabil COPD-s betegek indukált köpetében a sejtösszetétel mellett vizsgálták a különböző eredetű MP-ok számát is. Legnagyobb számban a gyulladásozó sejtek közül a neutrofilek, majd a makrofágok, végül a limfociták voltak kimutathatóak. Két beteg esetében találtak magasabb eozinofil számot. Mikropartikulumok tekintetében a pán leukocita (CD11a), granulocita (CD66b) monocita-makrofág (CD11b), trombocita (CD41), endotél sejt (CD31) és vörösvértest (CD235a) eredetűeket vizsgálták áramlási citometriával. A köpetben legnagyobb számban a granulocita eredetű MP-ok voltak jelen. A vörösvértest és endotél eredetű MP-ok kisebb, de elég magas számban voltak kimutathatók. Legkisebb mennyiségben a pán leukocita és trombocita eredetű MP-ok voltak jelen a köpetben.

A CD31⁺ MP-ok és a FEV1 között negatív korrelációt mutattak ki. A CD66b⁺ MP szám pozitív korrelációt mutatott a BODE (Body mass index airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise capacity) index-el és negatívan korrelált a '6-minute walking test' index-

el. GlyA⁺ MP-ok negatívan korreláltak a BMI index-el és pozitívan a dyspnea index-el. A MP szám és a köpet cellularitás valamint az exacerbációk száma között nem volt összefüggés [185].

Összességében elmondható, hogy a COPD-vel kapcsolatban az eddigi kutatások elsősorban az endotél eredetű MP-ok számát vizsgálták, abból kiindulva, hogy a betegséghez vezető különböző stimulusok és a betegségben fennálló gyulladás elsősorban a tüdőkapillárisok endotél sejtjeit károsítja. Az irodalomban azonban eddig nem található adat más eredetű MP mérésre a COPD-s betegek körében, holott a trombocita és leukocita eredetű MP-ok is szerepet játszhatnak az endotél sejtek apoptózisának ill. aktivációjának kiváltásában, ill. a COPD kialakulásában és progressziójában. Vizsgálatainkban a trombocita (CD61⁺, CD41⁺, CD42a⁺, PAC1⁺), leukocita (CD45⁺, CD13⁺), vörösvértest (CD235a⁺), limfocita (CD56⁺) és monocita (CD14⁺) eredetű MP-ok számában is találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és COPD-s ill. a kontroll és az akut exacerbációban lévő COPD-s betegcsoportok között. Az akut exacerbációban lévő betegek esetében a trombocita eredetű CD41⁺ és CD42a⁺, az aktivált endotél eredetű CD62E⁺ valamint a monocita eredetű CD14⁺ MP szám mutatott szignifikáns emelkedést a stabil COPD-s betegekhez viszonyítva.

Retrospektív vizsgálatunkban több olyan MP-t is találtunk, melyek COPD-ben a 7 éves halálozás előrejelzői lehetnek (AnnexinV⁺ össz MP, CD61⁺, CD13⁺, PAC1⁺, GlyA⁺). Független prediktornak a GlyA⁺ MP és a vörösvértest szám bizonyult. A stabil betegekben a gyakori exacerbációk előre jelzésére és körükben 7 éves időtartamban a halálozás előrejelzésére a CD45⁺ pán leukocita eredetű MP szám emelkedés lehet a legalkalmasabb. A háttérben álló patobiokémiai mechanizmus azonban még nem tisztázott.

A betegség kialakulásával és lefolyásával összefüggésben, nagyobb betegcsoporton a fenti MP-ok további vizsgálatokat igényelnek.

6. Új megállapítások

Laboratóriumi megállapítások

1. A rendelkezésre álló irodalmi adatokból kiindulva stabil módszert dolgoztunk ki a mikropartikulumok izolálására és Beckman-Coulter FC500 áramlási citométeren való mérésére.
2. Kimutattuk, hogy az általunk kidolgozott módszer a VK%-ok alapján (<20%) mindegyik CD markerrel jelölt MP szám tekintetében reprodukálható.
3. Igazoltuk, hogy a mintavételtől eltelt idő (1 órával mintavétel után) a mért MP mennyiségeket egyetlen CD marker esetében sem befolyásolja.
4. Referencia tartományt hoztunk létre egészséges egyénekből az 57 év (49-63) korosztályban a különböző sejt eredtű MP mennyiségekre, mely a későbbiekben összehasonlítási alapot képezett/képezhet a korban illő betegcsoportokhoz.

Klinikai megállapítások

MP-ok klinikai jelentősége a szeptikus betegekben

1. Kimutattuk, hogy súlyos szeptikus betegek esetén az össz mikropartikulum szám, a besorolás utáni 1., 3. és 5-ik napon szignifikánsan magasabb, mint a kontroll csoportban.
2. Súlyos szeptikus betegek esetében a besorolás utáni 1., 3. és 5.-ik napon a trombocita eredetű CD41⁺, CD61⁺ és CD42a⁺ MP szám szignifikáns emelkedését mutattuk ki a kontroll csoporthoz viszonyítva.
3. Az aktivációs PAC1 trombocita markert hordozó MP-ok számában viszont szignifikáns csökkenést mutattunk ki az 1. és az 5.-ik vizsgálati napon.
4. A különböző sejteredetű MP mennyiségek tekintetében egyik vizsgálati időpontban sem mutatható ki szignifikáns különbség a túlélő és a nem túlélő szeptikus beteg csoportok között.

5. Kimutattuk, hogy súlyos szeptikus betegekben az össz MP szám szignifikánsan magasabb a 2 szervet érintő szervelégtelenség esetén, mint az 5 szervelégtelenségben szenvedőknél.

MP-ok klinikai jelentősége COPD-s betegekben

1. Először igazoltuk, hogy a stabil és akut exacerbációban lévő COPD-s betegek keringésében szignifikánsan magasabb az **Annexin V⁺ össz MP** szám, a **trombocita eredetű CD61⁺, CD41⁺, CD42a⁺, PAC1⁺**, a **vörösvértest eredetű GlyA⁺**, a **leukocita eredetű CD45⁺, CD13⁺**, a **monocita eredetű CD14⁺** és a **limfocita eredetű CD56⁺** mikropartikulum szám az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Az irodalomban korábban csak **endotél eredetű CD31⁺** és **CD62E⁺** mikropartikulumokat vizsgálták, melyeknél szintén a fenti összefüggést találtuk.

2. Először írtuk le, hogy az akut exacerbációban lévő COPD-s betegek perifériás vérében a **CD62E⁺** endotél eredetű MP szám mellett a **trombocita eredetű CD41⁺, CD42a⁺** valamint a **monocita eredetű CD14⁺ MP** szám is szignifikánsan magasabb, mint a stabil COPD-s betegekben.

3. Kimutattuk, hogy a **trombocita eredetű PAC1⁺** aktivációs markert hordozó MP-ok száma szignifikánsan magasabb a súlyosabb COPD-ben (GOLD III-IV) szenvedőkben, mint a kevésbé súlyos (GOLD I-II) COPD-s betegek esetén.

4. A teljes COPD populációban a **vörösvértest szám és GlyA⁺** mikropartikulum szám a 7 éves mortalitás független prediktorának bizonyult.

5. A stabil COPD-s betegekben a pán **leukocita eredetű CD45⁺ MP** szám előre jelezte a 7 év alatti gyakori exacerbációt és a gyakori exacerbáció csoportban a mortalitás független prediktorának bizonyult.

7. Irodalom jegyzék

1. Vidal C, Spaulding Ch, Picard F, Schaison F, Melle J, Weber S, Fontenay-Roupie M: Flow cytometry detection of platelet procoagulant activity and microparticles in patients with unstable angina treated by percutaneous coronary angioplasty and stent implantation. *Thromb Haemost.* 2001;86:784-90.
2. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS: New horizons into the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med.* 2004;53(4):210-230.
3. Aradi D, Magyarlaki T, Tóké-Füzesi M, Rideg O, Vorobcsuk A, Sayour A, Horváth IG, Komócsi A. Comparison of conventional aggregometry with VASP for monitoring P2Y₁₂-specific platelet inhibition. *Platelets.* 2010;21(7):563-70.
4. Rideg O, Magyarlaki T, Tóké-Füzesi M, Miseta A, Kovács GL, Horváth IG, Komócsi A, Aradi D. Impact of genetic variants on post-Clopidogrel platelet reactivity in patients after elective percutaneous coronary intervention. *Pharmacogenomics.* 2011;12(9):1269-80.
5. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946;166:189-197.
6. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13:269-288.
7. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost.* 2009;101(3):439-451.
8. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwège V, Hedman H, Freyssinet JM. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1994;15(7):3245-55.
9. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest.* 1999;104(1):93-102.
10. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nature Reviews Rheumatology.* 2012;8:534-42.
11. Smalley DM, Sheman NE, Nelson K, Theodorescu D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J. Proteome Res.* 2008;7(5):2088-96.

12. Morel N, Morel O, Petit L, Hugel B, Cochard JF, Freyssinet JM, Sztark F, Dabadie P. Generation of procoagulant microparticles in cerebrospinal fluid and peripheral blood after traumatic brain injury. *J Trauma*. 2008;64(3):698-704.
13. Rene J, Berckmans RJ, Sturk A, van Tienen LM, Schaap CLM, Nieuwland R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood*. 2011;117(11):3172-80.
14. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett*. 2006;107(2):102-8.
15. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem*. 1987;262(19):9412-20.
16. Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G (2006). Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J. Biochem*. 2006;140 (1):13-21.
17. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *The EMBO Journal*. 2011;30(17):3481-3500.
18. Futter CE, Pearse A, Hewlett LJ, Hopkins CR. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol* 1996;132:1011-23.
19. Mullock BM, Bright NA, Fearon CW, Gray SR, Luzio JP. Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediatedensity and is NSF dependent. *J Cell Biol*. 1998;140:591-601
20. Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 2001;166:7309-18.
21. Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol*. 2002;168:3235-41.
22. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:569-79.
23. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multi vesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*. 1998;273:20121-7.

24. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999;94(11):3791–9.
25. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:13368–73.
26. Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, Kubo M, Yamanaka N, Tasaki A, et al. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res*. 2005;25:3703–7.
27. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev*. 2012;64(3):676–705.
28. Bang C, Thum T. Exosomes: New players in cell-cell communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2012;44(11):2060–4.
29. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009;19(2):43–51.
30. Hristov M, Erl W, Linder S, and Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2004;104:2761–2766.
31. Turiák L, Misják P, Szabó TG, Aradi B, Pálóczi K, Ozohanics O, Drahos L, Kittel A, Falus A, Buzás EI et al. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *J Proteomics*. 2011;74:2025–2033.
32. Bilyy RO, Shkandina T, Tomin A, Mun oz LE, Franz S, Antonyuk V, Kit YY, Zirngibl M, Fürnrohr BG, Janko C et al. (2012) Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles. *J Biol Chem*. 2012;287:496–503.
33. Zhivotovsky B, Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: perspective from the cell death community. *Cell Calcium*. 2011;50(3):211–21.
34. Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, and Porter AG (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273:9357–9360.
35. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2003;4(7):552–65.

36. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 2010;103(5):1044–52.
37. Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE et al. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost.* 2001;85(5):810–20.
38. Piccin A, Murphy W G, Smith O P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007;21(3):157-171.
39. Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:22–7.
40. Ullal AJ, Pisetsky DS, Reich CF. Use of SYTO 13, a fluorescent dye binding nucleic acids, for the detection of microparticles in in vitro systems. *Cytometry A.* 2010;77(3):294–301.
41. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2003;59:277–287.
42. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest.* 2004;34:392–401.
43. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension.* 2006;48:180–186.
44. Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb Res.* 2008;123:8–23.
45. Tushuizen ME, Michaela Diamant M, Sturk A, Nieuwland R. Cell-Derived Microparticles in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease: Friend or Foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:4-9.
46. Fadeel B, Xue D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2009;44(5):264–77.
47. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005;62(9):971–88.
48. Morel O, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:15-26.

49. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, Ataullakhanov FI. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost.* 2007;97:425–434.
50. Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood.* 1996;87:1409–1415.
51. Rosing J, Bevers EM, Comfurius P, Hemker HC, van Dieijen G, Weiss HJ, Zwaal RF. Impaired factor X and prothrombin activation associated with decreased phospholipid exposure in platelets from a patient with a bleeding disorder. *Blood.* 1985;65:1557–1561.
52. Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol.* 1997;96:458–463.
53. Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell.* 1995;80:919–927.
54. Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Doepf YA, van den Bos AG, Bosman GJ, Van Berkel TJ. Liver Kupfer cells rapidly remove red blood-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood.* 2005;105:2141–2145.
55. Pattanapanyasat K, Gonwong S, Chaichompoo P, Noulsri E, Lerdwana S, Sukarpirom K, Siritanaratkul N, Fucharoen S: Activated platelet-derived microparticles in thalassemia. *Br J Haematol.* 2007;136:462–471.
56. Sharma R, Muttill P, Yadav AB, Rath SK, Baipai VK, Mani U, Misra A. Uptake of inhalable microparticles affects defence responses of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:499–506.
57. Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36:182–187.
58. Rand ML, Wang H, Bang KW, et al. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1621–1623.
59. Bocci V, Pessina GP, Paulesu L. Studies of factors regulating the aging of human erythrocytes. III. Metabolism and fate of erythrocytic vesicles. *Int J Biochem.* 1980;11:139–142.

60. Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Gruetzner S, Iberer M, Toth B, Pihusch E. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets*. 2011;22:111–116.
61. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. 2009;101:439–451.
62. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood*. 2000;96:170-175.
63. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P et al. Tissue-factor bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005;106:1604-1611.
64. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J. Exp. Med*. 2003;197(11):1585–98.
65. Owens P III, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*. 2011;108:1284-1297.
66. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost*. 2003;1:1655-1662.
67. Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schömig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2005;93(1):35–39.
68. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijssma O, Nieuwland R, Schwaeble WJ et al. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*. 2002;32:1726–36.
69. Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*. 2000;95:1317–23.
70. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1998;102:136–44.
71. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1997;99:2118–27.
72. Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D, FitzGerald GA. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*. 1999;274:7545–56.

73. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*. 2001;15: 825–35.
74. Jodo S, Xiao S, Hohlbaum A, Strehlow D, Marshak-Rothstein A, Ju ST. Apoptosis-inducing membrane vesicles: a novel agent with unique properties. *J Biol Chem*. 2001;276:39938–44.
75. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med*. 2002;195:1303–16.
76. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*. 2004;104:2543–8.
77. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui N. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. 2006;48:180-86.
78. Nomura S, Shouzu A, Omutu S et al. Effects of eicosapentaenoic acid on endothelial cell-derived microparticles, angiopoietins and adiponectin in patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:83-90.
79. van der Zee PM, Bíro E, Ko Y et al. P-selectin and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease an myocardial infarction. *Clin Chem*. 2006;52:657-664.
80. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2003;145:962-970.
81. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K et al. Elevated levels of VE-cadherin positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1622-1630.
82. Werner N, Wassmann S, Ahlers P et al. Circulating CD31+/AnnexinV+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:112-116.
83. Leroyer S, Isobe H, Leseche G et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:772-777.
84. Nomura S, Imamura A, Kamihata H et al. Platelet derived microparticles in patients with atherosclerosis obliterans: enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines. *Thromb Res*. 2000;98:257-268.

85. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*. 2003;41:211-17.
86. Feng B, Chen Y, Luo Y et al. Circulating levels of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilatation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2010;208:264-269.
87. Ogata N, Imazumi M, Nomura S et al. Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;68:193-201.
88. Ogata N, Nomura S, Shouzu A et al. Elevation of monocyte-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006;73:241-48.
89. Nomura S, Miyazaki Y, Miyake T et al. Detection of platelet-derived microparticles in patients with diabetes mellitus. *Am J Hematol*. 1993 Nov;44(3):213.
90. Nomura S, Suzuki M, Katsura K et al. Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1995;116:235-240.
91. Tan KT, Tayebjee MH, Lim HS et al. Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticle levels. *Diabetes Med*. 2005;22:1657-1662.
92. Omoto S, Nomura S, Shouzu A et al. Detection of monocyte-derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002;45:550-555.
93. Huisse MG, Lanoy E, Theche D et al. Prothrombotic markers and early spontaneous recanalisation in ST-segment elevation myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2007;98:420-426.
94. Matsumoto N, Nomura S, Kamihata H et al. Association of platelet-derived microparticles with C-C chemokines on vascular complication in patients with acute myocardial infarction. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2002;8:279-286.
95. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000;10:841-843.
96. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro Ch et al. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int Journ of Cardiology*. 2004;97(3):439-446.

97. Heloïre F, Weill B, Weber S et al. Aggregates of endothelial microparticles and platelets circulate in peripheral blood. Variations during stable coronary disease and acute myocardial infarction. *Thromb Res.* 2003;110:173-180.
98. Biasucci LM, Porto I, Di Vito L et al. Differences in microparticle release in patients with acute coronary syndrome and stable angina. *Circ J.* 2012;76(9):2174-82.
99. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *Journ of Biol Chemistry.* 1989;264(29):17049-17057.
100. Bevers EM, Wiedmer T, Comfurius P, Shattil SJ, Weiss HJ, Zwaal RF, Sims PJ. Defective Ca(2+)-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome. *Blood.* 1992;79(2):380-388.
101. Castaman G, Yu-Feng L, Rodeghiero F. A bleeding disorder characterised by isolated deficiency of platelet microvesicle generation. *Lancet.* 1996;347: 700–701.
102. Stormorken H, Holmsen H, Sund R et al. Studies on the haemostatic defect in a complicated syndrome. An inverse Scott syndrome platelet membrane abnormality? *Thromb Haemost* 1995;74:1244–1251.
103. Wakefield TW, Henke PK. The role of inflammation in early and late venous thrombosis: Are there clinical implications? *Semin Vasc Surg.* 2005;18:118–129.
104. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll of Cardiol.* 2005;45(9):1467-1471.
105. Rectenwald JE, Myers DD Jr, Hawley AE et al. D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study. *Thromb Haemost.* 2005;94(6):1312-17.
106. Bucciarelli P, Martinelli I, Artoni A et al. Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism. *Thrombosis Research.* 2012;129:591–597.
107. Hughes M, Hayward CPM, Warkentin TE et al. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2000;96(1):188-194.
108. Warkentin TE, Hayward CPM, Boshkov LK, et al. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: An explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 1994;84:3691–3699.

109. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2004;91:667–673.
110. Jy W, Tiede M, Bidot CJ et al. Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 2007;121:319–325.
111. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM et al. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br J Haematol.* 2001;112:81–90.
112. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM et al. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol.* 2003;123:896–902.
113. Hugel B, Socie G, Vu T, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood.* 1999;93:3451–3456.
114. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, et al. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1993;82:1192–1196.
115. Kozuma Y, Sawahata Y, Takei Y et al. Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 2011;152(5):631-9.
116. Wun T, Paglieroni T, Rangaswami A, et al. Platelet activation in patients with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 1998;100:741–749.
117. Shet AS, Aras O, Gupta K, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood.* 2003;102:2678–2683.
118. van Beers EJ, Schaap MCL, Berckmans RJ et al. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica.* 2009;94(11):1513–1519.
119. Habib A, Kunzelmann C, Shamseddeen W et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with β -thalassemia intermedia. *Haematologica.* 2008;93(6):941-42.
120. Nieuwland R et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood.* 2000; 95:930-935.

121. Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE et al. Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost.* 2001;85:810-820.
122. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2005;33:2540-2546.
123. Fujimi S, Ogura H, Tanaka H et al. Activated polymorphonuclear leukocytes enhance production of leukocyte microparticles with increased adhesion molecules in patients with sepsis. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care.* 2002;52(3):443-448.
124. Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H et al. Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *Trauma-Injury Infection & Critical Care.* 2001;50(5):801-809.
125. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am Journ of Resp and Crit Care Med.* 2008;178(11):1148–1155.
126. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J et al. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS.* 2003;17:33–42.
127. Correas-Medina VF, Simkins J, Chirinos JA et al. Increased levels of platelet microparticles in HIV-infected patients with good response to highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;54:217-218.
128. Robertson C, Booth SA, Beniac DR et al. Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood.* 2006;107:3907-3911.
129. Toth B, Nieuwland R, Liebhardt S et al. Circulating microparticles in patients with breast cancer: a comparative analysis with established biomarkers. *Anticancer Res.* 2008;28:1107–12.
130. Tilley RE, Holscher T, Belani R et al. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. *Thrombosis Research.* 2008;122:604–609.
131. Manly DA, Wang J, Glover SL, Kasthuri R, Liebman HA, Key NS, Mackman N. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2010;125(6):511–512.

132. Campello E, Spiezia L, Radu CM, et al. Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2011;127(5):473–477.
133. Knijff-Dutmer EAJ, Koerts J, Nieuwland R et al. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2002; 46(6):1498–1503.
134. Berckmans RJ, Nieuwland R, Kraan MC et al. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. *Arthritis Research & Therapy.* 2005;7:R536-R544.
135. Umekita K, Hidaka T, Ueno S et al. Leukocytapheresis (LCAP) decreases the level of platelet-derived microparticles (MPs) and increases the level of granulocytes-derived MPs: a possible connection with the effect of LCAP on rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2009;19:265–72.
136. Jy W, Horstmann LL, Jimenez JJ, Ahn S. Measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2004;2:1842–1851.
137. Ito T, Sun L, Henriquez RR, Crooks RM. A carbon nanotube-based coulter nanoparticle counter. *Acc Chem Res.* 2004;37:937–45.
138. Zwicker JJ, Liebman HA, Neuberger D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6830–40.
139. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen G, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2596–607.
140. Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, Ashcroft B, Garcia Rodriguez P, Bertina RM, et al. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost.* 2010;8(2):315–23.
141. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:13368–73.
142. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine.* 2011;7(6):780–8.
143. Gritters M, Grooteman MP, Schoorl M, Bartels PC, Scheffer PG, Teerlink T, Schalkwijk CG, Spreeuwenberg M, Nube MJ. Citrate anticoagulation abolishes degranulation of polymorpho-nuclear cells and platelets and reduces oxidative stress during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:153–9.

144. Morel O, Toti F, Jesel L, Freyssinet JM. Mechanisms of microparticle generation: on the trail of the mitochondrion! *SeminThromb Hemost.* 2010;36:833–44.
145. Enjeti AK, Lincz LF, Seldom M. Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology. *Semin Thromb Hemost.* 2007;33:771-779.
146. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost.* 2012;10:437-46.
147. Mullier F, Bailly N, Chatelain C, Chatelain B, Dogne J-M. Pre-analytical issues in the measurement of circulating microparticles: current recommendations and pending questions. *J Thromb Haemost.* 2013;11:693–696.
148. McCoy JP. Basic principles of flow cytometry. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2002;16(2):229–43.
149. Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology.* 2012;64(2):109–30.
150. van der Pol E, van Gemert MJC, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost.* 2012;10(5):919–30.
151. A fehérje kutatás modern módszertana. e-book. szerk: Ludány A., Medicina Könyvkiadó, 2011:240-250.
152. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J and Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost.* 2009;7:190-197.
153. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F, On behalf of the ISTH SSC Workshop. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost.* 2010;8:2571–2574.
154. Dellinger RP et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Critical Care Medicine.* 2008;36(1):296-327.
155. Marshall C, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Critical Care Medicine.* 1995;23(10):1638-1652.

156. Vincent JL et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Medicine*. 1996;22(7):707-710.
157. Böszörményi Nagy György, *Pulmonológiai útmutató*, Medition Kiadó 2010. (96-130).
158. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001;85(4):639-46.
159. Nielsen H, Beck-Nielsen H, Nørgaard Andersen M, Handberg A. A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014;3. doi: 10.3402/jev.v3.20795.
160. Gustafson CM, Shepherd AJ, Miller VM, Jayachandran M. Age- and sex-specific differences in blood-born microvesicles from apparently healthy humans. *Biology of Sex Differences*. 2015;6:2-10.
161. Corbi G, Bianco A, Turchiarelli V, et al. Potential mechanisms linking atherosclerosis and increased cardiovascular risk in COPD: focus on Sirtuins. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):12696–12713. doi:10.3390/ijms140612696.
162. Tuleta I, Farrag T, Busse L, et al. High prevalence of COPD in atherosclerosis patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017;12:3047–3053. Published 2017 Oct 19. doi:10.2147/COPD.S141988.
163. MacNee W, Maclay J, Mcalister D. Cardiovascular injury and repair in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:824-33.
164. Morgan AD, Zakeri R, Quint JK. Defining the relationship between COPD and CVD: what are the implications for clinical practice?. *Ther Adv Respir Dis*. 2018;12:1753465817750524. doi:10.1177/1753465817750524.
165. Rothnie KJ, Yan R, Smeeth L, Quint JK. Risk of myocardial infarction (MI) and death following MI in people with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a systemic review and meta-analysis. *BMJ open*. 2015;5(9):e007824.
166. Serapinas D, Narbekovas A, Juskevicius J, Sakalauskas R. Systemic inflammation in COPD in relation to smoking status. *Multidiscip Respir Med*. 2011;6(4):214–219. doi:10.1186/2049-6958-6-4-214.
167. Margetic S. Inflammation and haemostasis. *Biochem Med*. 2012;22(1):49–62.

168. Conglei Li, June Li, Yan Li, et al., “Crosstalk between Platelets and the Immune System: Old Systems with New Discoveries,” *Advances in Hematology*, vol. 2012, Article ID 384685, 14 pages, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/384685>.
169. Elzey BD, Ratliff TL, Sowa JM, Crist SA. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thromb Res.* 2010;127(3):180–183. doi:10.1016/j.thromres.2010.10.011.
170. Finsterbusch M, Schrottmaier WC, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Assinger A. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets.* 2018;29(7): 677-685. DOI: 10.1080/09537104.2018.1430358.
171. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, He M, Yamada M, Suzuki S, Yanai M, Kurosawa S, Yamaya M, Kubo H. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. *Thorax.* 2012;67(12):1067-74.
172. Thomashow MA, Shimbo D, Parikh MA, Hoffman EA, Vogel-Claussen J, Hueper K, Fu J, Chia-Ying Liu, Bluemke DA, Ventetuolo CE, Doyle MF, Graham Barr R. Endothelial microparticles in mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease and emphysema The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Chronic Obstructive Pulmonary Disease Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(1):60–68.
173. Gordon C, Gudi K, Krause A, Sackrowitz R, Harvey BG, Strulovici-Barel Y et al. Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:224-32.
174. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci.* 2016;17(11):1801.
175. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, Tando Y, Yamada M, Yanai M, Yamaya M, Kurosawa S, Yamauchi M, Kubo H. Annual FEV1 changes and numbers of circulating endothelial microparticles in patients with COPD: a prospective study. *BMJ Open.* 2014;4: e004571.
176. Muñoz-Esquerre M, Ferreira JL, Huertas D, Marcano AL, López-Sánchez M, Roura G. Gómez-Hospital JA, Dorca J, Cequier A, Santos S. Impact of acute exacerbations on platelet reactivity in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Int. Journ of COPD* 2017;Vol.13:141-148. DOI <https://doi.org/10.2147/COPD.S152660>.
177. Aleva F, De Mast Q, Van Bragt K, De Groot P, Heijdra Y, Van Der Ven A. Platelets of COPD patients are hyper-responsyve. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2016;193:A4897.

178. Aleva FE, Temba G, de Mast Q, Simons SO, de Groot PG, Heijdra YF, van der Ven AJAM. Increased platelet-monocyte interaction in stable COPD in the absence of platelet hyper-reactivity. *Respiration*. 2018;95(1):35-43.
179. Maclay JD, McAllister DA, Johnston S, Raftis J, McGuinness C, Deans A, Newby DE, Mills NL, MacNee W. Increased platelet activation in patients with stable and acute exacerbation of COPD. *Thorax*. 2011;66:769-774.
180. Zieliński J. Effects of long-term oxygen therapy in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 1999;5(2):81-7.
181. Sarkar M, Rajta PN, Khatana J. Anemia in Chronic obstructive pulmonary disease: Prevalence, pathogenesis, and potential impact. *Lung India*. 2015;32(2):142-51.
182. Ugurlu E, Kilic-Toprak E, Can I, Kilic-Erkek O, Altinisik G, Bor-Kucukatay M. Impaired Hemorheology in Exacerbations of COPD. *Canadian Respiratory Journal*, vol. 2017, Article ID 1286263, 8 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1286263>.
183. Yang L, Andrews DA, Low PS. Lysophosphatidic acid opens a Ca⁺⁺ channel in human erythrocytes. *Blood*. 2000; 95(7):2420–2425.
184. Pawloski JR, Hes DT, Stamler JS. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature*. 2001; vol 409, no. 6820:622–626.
185. Lacedonia D, Carpagnano GE, Trotta T et al. Microparticles in sputum of COPD patients: a potential biomarker of the disease? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:527-33. doi:10.2147/COPD.S99547.
186. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004; 364:709–721.
187. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S et al. The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645–2653.
188. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:469–473.
189. Turato G, Zuin R, Miniati M et al. Airway Inflammation in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Relationship with Lung Function and Radiologic Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:105–110, DOI: 10.1164/rccm.2111084.

190. Hoenderdos K, Condliffe A. The Neutrophil in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Too Little, Too Late or Too Much, Too Soon? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2013;Vol 48(5): 531-539. DOI:10.1165/rcmb.2012-0492TR.
191. Stanescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, et al. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*, 1996;51(3):267–71.
192. Pizzichini E, Pizzichini MM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(5 Pt 1):1511–7.
193. Chung K F, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *European Respiratory Journal* Jun 2008;31(6): 1334-1356; DOI: 10.1183/09031936.00018908.
194. Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, et al. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004; 125: 71–76.
195. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, et al. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165: 1404–1409.
196. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas N M. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respiratory Medicine*. 2003;Vol.97(8): 863 – 871.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Prof. Dr. Kovács L. Gábornak, hogy biztosította számomra a kutatáshoz szükséges feltételeket, a sok értékes tanácsát, szakmai támogatását és töretlen bizalmát, valamint társtémavezetőmnek, Dr. Molnár Tihamérnak a sok hasznos gyakorlati tanácsot és segítségét a klinikai adatok elemzésében és kiértékelésében.

Köszönettel tartozom Dr. Magyarlaci Tamásnak, hogy megismertette és megszerettette velem az áramlási citometriát, a sok előrevívő szakmai és baráti beszélgetésért, a támogatásáért és bizalmaért. Köszönöm Prof. Dr. Vermes Istvánnak, aki lehetővé tette, hogy találkozhatssak Prof. Dr. Auguste Sturkkel és Dr. Rien Nieuwlanddal a mikropartikulumok elismert kutatóival és néhány nap erejéig betekintést nyerjek amszterdami laboratóriumuk munkájába. Sajnos e dolgozat elkészültét egyikőjük sem érthette meg.

Köszönöm Prof. Dr. Miseta Attilának, hogy megismertette velem a kutatói munkát, később pedig szigorával és hajthatatlanságával nagyban hozzájárult dolgozatom létrejöttéhez.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Kellermayer Miklósnak, hogy annak idején ismeretlenül is bízott bennem és lehetővé tette pályakezdésemet a laboratóriumi szakma területén, később pedig a sok biztatást.

Köszönöm Dr. Mühl Diánnának és Dr. Ruzsics Istvánnak a szeptikus. ill. a COPD-s betegek besorolásában, klinikai adatainak gyűjtésében és a pontos mintatovábbításában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Woth Gábornak és Dr. Kustán Péternek a szeptikus - ill. a COPD-s betegadatok statisztikai elemzésében nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni kollégáimnak és egyben barátaimnak Dr. Lakatos Ágnesnek, Prof. Dr. Ludány Andreának, Dr. Liszt Ferencnek, Prof. Dr. Kőszegi Tamásnak és Dr. Kiss Gabriellának a sok buzdítást és lelki támogatást.

És végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Szüleimnek és Nagytatámnak, hogy verejtékes, fáradtságos és néha erejüket meghaladó munkájukkal lehetővé tették számomra, hogy orvos lehessenek.

Hálával tartozom lányomnak, Teklának és páromnak, Karcsinak azért a sok-sok szeretetért és törődésért, amivel körülvettek, szikla szilárd hátteret biztosítva munkámhoz.

9. Közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény:

Tőkés-Füzesi M, Ruzsics I, Rideg O, Kustán P, Kovács GL, Molnár T. Role of microparticles derived from monocytes, endothelial cells and platelets in the exacerbation of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018 Nov 15;13:3749-3757. doi: 10.2147/COPD.S175607. eCollection 2018.

IF: 2,917

Az értekezéssel kapcsolatos közlemények

Tőkés-Füzesi M*, Woth G*, Ernyey B, Vermes I, Mühl D, Bogár L, Kovács GL. Microparticles and acute renal dysfunction in septic patients *J Crit Care*. 2013 apr. Vol: 28(2): 141-147. * jel egyenlő hozzájárulást jelent a két szerző részéről

IF: 2,191; IF az egyenlő (50%-os) hozzájárulás alapján 1,095 Cit: 17

Woth G*, **Tőkés-Füzesi M***, Magyarlaki T, Kovács GL, Vermes I, Mühl D. Activated platelet-derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (*Candida albicans*) sepsis *Ann Clin Biochem*. 2012 Vol.:49(6): 554-560. * jel egyenlő hozzájárulást jelent a két szerző részéről

IF: 1,922; IF az egyenlő (50%-os) hozzájárulás alapján 0,961 Cit: 15

Összesített IF: 4,113; IF az 50%-os hozzájárulás alapján 2,056 Összesített Cit: 32

A témához kapcsolódó idézhető absztraktok

Tőkés-Füzesi M, Magyarlaki T, Vermes I, Kovács LG. Introduction of a flow cytometric method for microparticle measurements *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol.: 49, suppl.: 1, p. S358-S358, may 2011.

IF: 2,15

Woth G, **Tőkés-Füzesi M**, Magyarlaki T, Vermes I, Kovács LG, Mühl D. Platelet and endothelial receptor density changes in severe septic patients *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol.: 49, suppl.: 1, p. S357-S357, may 2011.

IF: 2,15

Ruzsics I, Singoszki Sz, Illés MB, Sárosi V, Balikó T, **Tőkés-Füzesi M**, Kőszegi T, Woth G, Vermes I, Kovács LG. Microparticles in stable and exacerbated COPD patients *European Respiratory Journal*, 2013; Vol: 42, P777 (Suppl. 57).

IF: 7,125

Ruzsics I, Tőkés-Füzesi M, Matancic M, Sárosi V, Woth G, Molnár T. Predictive value of CD14 and CD31 microparticles for the survival of COPD during 7 years. *European Respiratory Journal*, 2018; 52: Supp. 62, PA3852; DOI: 10.1183/13993003.

IF: 12,242

Tókécs-Füzesi M, Ruzsics I, Kustán P, Molnár T, Kovács GL. Microparticles as potential biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. Clin Chem Lab Med, 2018; 56(9):eA155.P26; DOI 10.1515/cclm-2018-0718.

IF: 3,556

Összesített IF: 27,223

Más témában megjelent közlemények

Tókécs F. A, **Füzesi M**, Ember I: A metasztázis képződés molekuláris aspektusai (review) Orvosképzés, 1995, 6:362-370.

Cit:1

Tókécs F. A, **Füzesi M**, Ember I: A retinoidok onkogenetikai hatásai (review) Lege Artis Medicinae, 1996, 6(9-10): 508-515.

Selypes A, **Tókécs-Füzesi M**, Serényi P, Ember I: Investigation of the total RNA expression of the genes c-myc and p53 in the testis of mice treated with cadmium. Central European Journal of Occupational and Env. Medicine, 1998, 4(1): 36-44.

Cit:3

Miseta A, Kellermayer M, Liszt F, Ludány A, Magyarlaci T, Sipos K, Berkó Gy, **Tókécs-Füzesi M**: A vérplazma elektrolitjai myeloma multiplexben. Orvosi Hetilap, 2001. 142(17): 1449-53.

Tókécs-Füzesi M, Bedwell DM, Repa I, Sipos K, Sümegi B, Rab A, Miseta A: Hexose Phosphorylation and the Putative Calcium Channel Component Mid1-p are Required for the Hexose-Induced Transient Elevation of Cytosolic Calcium Response in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology, 2002. 44: 1299-1308.

IF: 5,832

Cit: 37

Miseta A, **Tókécs-Füzesi M**, Aiello DP, Bedwell DM A *Saccharomyces cerevisiae* mutant unable to convert glucose to glucose-6-phosphate accumulates excessive glucose in the endoplasmic reticulum due to core oligosaccharide trimming. Eukaryotic Cell 2(3):534-41. July 2003.

IF: 3,399

Cit: 19

Szendrei T, Magyarlaci T, Rideg O, **Tókécs-Füzesi M**, Kovács G, Nagy Á, Szomor Á, Molnár L, Dávid M, Pótó L, Pajor L és Losonczy H: Multidrog rezisztencia vizsgálatok chronicus lymphoid leukaemiában. Orvosi Hetilap, 149 évf. 4 szám, 161-167, 2008.

Cit: 5

Aradi D, **Tókécs-Füzesi M**, Paska T, Komócsi A: Monitoring the efficacy of antiplatelet therapy: all methods are equal, but some methods are more equal than others? American Heart Journal, 155(4): 2008.

IF: 4,285

Cit:2

Papp E, Sinkovitz A, Paraicz G, **Tóké-s-Füzesi M**, Magyarlaki T, Sárosi V, Balikó Z. A vasháztartás állapota krónikus légzési elégtelenségben szenvedő COPD-s betegek-nél. *Medicina Thoracalis* LXII.1. febr.: 27-35, 2009.

Gyarmati J, **Tóké-s-Füzesi M**, Kovács GL, Gaál V, Vida G, Ertl T. Fructosamine levels and hyperglycaemia in preterm neonates. *Neonatology*, 95(4): 267-270,2009.

IF: 1,984

Cit: 2

Aradi D, Komocsi A, Vorobcsuk A, Rideg O, **Tóké-s-Füzesi M**, Magyarlaki T, Horváth G I, Serebruany LV. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: Systematic review and meta-analysis. *Am Heart J*. 2010 Sep;160(3):543-51. Review.

IF: 5,052

Cit:160

Aradi D, Magyarlaki T, **Tóké-s-Füzesi M**, Rideg O, Vorobcsuk A, Sayour A, Horváth IG, Komócsi A. Comparison of conventional aggregometry with VASP for monitoring P2Y12-specific platelet inhibition. *Platelets*. 2010;21(7):563-70.

IF: 2,117

Cit:14

Rideg O, Magyarlaki T, **Tóké-s-Füzesi M**, Miseta A, Kovács G L, Horváth I G, Komócsi A, Aradi D. Impact of genetic variants on post-Clopidogrel platelet reactivity in patients after elective percutaneous coronary intervention. *Pharmacogenomics*. 2011 Sep;12(9):1269-80.

IF: 3,974

Cit: 42

Frank D, Cseh G, Kocsis B, Nagy T, Borsiczky B, **Tóké-s-Füzesi M**, Miseta A. Polymethyl-methacrylate-sorbitol based capsules as local drug delivery vehicles: in vitro antibiotic elution study. *Cell Biol Int*. 2011 Feb 8;35(3):267-272.

IF: 1,482

Cit: 1

Kupó P, Aradi D, Tornóyos A, **Tóké-s-Füzesi M**, Komócsi A. Assessment of platelet function in patients receiving tirofiban early after primary coronary intervention. *Interv Med Appl Sci*. 2016 Dec;8(4):135-140.

IF: 1,24

Cit:1

Faludi R, NagyG, **Tóké-s-Füzesi M**, Kovács K, Czirják L, Komócsi A. Galectin-3 is an independent predictor of survival in systemic sclerosis. *Int J Cardiol*. 2017 Apr 15;233:118-124.

IF: 4,638

Cit:2

Összesített IF: 41,128

Összesített Cit: 284

Könyvfejezetek

Könyvfejezet (magyar):

Klinikai Biokémia (Egyetemi jegyzet, 284 oldal) 2001.

Véralvadás, Szív és harántcsíktolt izom betegségek laboratóriumi diagnosztikája fejezet

A fehérjekutatás modern módszertana,
szerző: Ludány Andrea, E-book, (ISBN, <http://tamop.etk.pte.hu/TF/>), Medicina Kiadó
2012, TÁMOP-4.1.2.-08/1/A-209-0054

Könnvfejezet: A vérszérum és vérplazma fehérje vizsgálatai; A hemosztázis vizsgálatok
fehérje módszertana; A thromboembóliás kórképek fehérje diagnosztikája.

Könyvfejezet (angol):

My first book on bioanalytical methods, Editors: Mihaela Badea, Monica Florescu;
Transilvania University Press 2010 (ISBN 978-973-598-743-5)

Chapter: **M. Tóké-Füzesi**, O. Rideg, T. Szendrei, T. Magyarlaci: Analysis of
multidrug resistance (MDR) mechanism – flow cytometric and molecular biological
techniques p. 177-182.

Bioanalytical methods for life sciences. Immunochemical methods. Applied
bioanalytical methods in medicine, food control and environmental protection;

E-book, Editors: Mihaela Badea, Monica Florescu, Gheorghe Coman; Editura
Universitatii Transilvania din Brasov 2010 (ISBN 978-973-598-724-4)

Chapter: **M. Tóké-Füzesi**, O. Rideg, T. Szendrei, T. Magyarlaci: Analysis of
multidrug resistance (MDR) mechanism – flow cytometric and molecular biological
technics p. 156-163.

Diagnostic methods in human pathology, Edited by: Antonella Chesca;

Editura Transilvania University Press Brasov 2012 (ISBN 978-606-19-0059-6)

Chapter: **M. Tóké-Füzesi**: Application of protein electrophoresis in routine laboratory
practice p. 121-126.

Modern diagnostic methods for human diseases, Edited by: Antonella Chesca;

Editura Transilvania University Press Brasov 2013 (ISBN 978-606-19-0213-2)

Chapter: **M. Tóké-Füzesi**, G.L.Kovács: Microparticles in health and disease p. 99-107.

A témához nem kapcsolódó idézhető absztraktok

Tóké-Füzesi M, Rideg K, Vermes É, Ember I: Effects of β -carotene on gene
expressions in Cyclophosphamide treated mice. Int. J. Oncol, Vol. 7.(suppl), p. 1007,
1995.

IF: 1,110

Vermes É, Rideg K, **Tóké-Füzesi M**, Perjési P, Szabó T, Ember I, Tóth Gy: Effect of
 β -carotene on the genotoxic changes induced by Cyclophosphamide. Int. J. Oncol.,
Vol. 7. (suppl): 1000, 1995.

IF: 1,110

Tóké A, **Tóké-Füzesi M**, Ember I: Oncogene expressions in different metastatic and non metastatic tumors. *Int. J. Oncol.*, Vol. 7. (suppl), p. 1007, 1995.

IF: 1,110

Rideg O, Teibert A, Magyarlaki T, **Tóké-Füzesi M**, Miseta A, Schmelcz M, Kovács LG: Appearance of multidrug resistance (MDR) as an early predictor of relapse in imatinib treated chronic myeloid leukaemia patients. *Clinica Chimica Acta* 355: S285-S285 Suppl. S MAY 2005.

IF: 2,149

Szendrei T, Magyarlaki T, **Tóké-Füzesi M**, Rideg O, Kovács G, Poto L, Nagy A, Szomor A, Molnár L, Dávid M, Losonczy H: Multidrug-resistance in chronic lymphocytic leukemia *Blood Reviews* Vol 21, Suppl 1, S-140, 2007.

IF: 5,92

Gyarmati J, **Tóké-Füzesi M**, Kovács LG, Gaal V, Vida G, Ertl T: Fructosamine levels and hyperglycemia in preterm neonates. *Acta Paediatrica* 96,24-25, 2007.

IF: 1,411

Márky-Zay J, Tauber K Jakab, **Tóké-Füzesi M**, Magyarlaki T, Baráth S, Kappelmayer J. Laboratory validation of the Multidrugquant™(MDQ) assay kit. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol.: 49, suppl.: 1, p. S474-S474, may 2011.

IF: 2,15

Gergics R, Ács O, Hantosi M, **Tóké-Füzesi M**, Rábai Tóthné I, Kovács GL. Comparison of two reagents measuring Heparin (UFH, LMWH). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Vol.: 49, suppl.: 1, p. S499-S499, may 2011.

IF: 2,15

Kiss G, **Tóké-Füzesi M**, Hussain A, Márton Zs, Hágendorn R. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: case study of an uncommon syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(10): eA157–eA211. YF3.

IF: 3,017

Tóké-Füzesi M, Kiss G, Dobos Á, Gerdei Zs, Miseta A. The presence of a rare haemoglobin variant in a family. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(10): eA157–eA211. P6.

IF: 3,017

Kiss G, **Tóké-Füzesi M**, Ács O, Miseta A. First experiences using a newly installed fully automated hematology analyser system: the Sysmex-XN-series. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(9): eA165.P51; DOI 10.1515/cclm-2018-0718

IF: 3,556

Összesített IF: 26,7

Role of microparticles derived from monocytes, endothelial cells and platelets in the exacerbation of COPD

Margit Tókécs-Füzesi¹
István Ruzsics²
Orsolya Rideg³
Péter Kustán¹
Gábor L Kovács^{1,4}
Tihamér Molnár⁵

¹Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary; ²1st Department of Internal Medicine, Division of Pulmonology, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary; ³Department of Pharmacy, University of Pécs, Pécs, Hungary; ⁴Szentágotthai Research Centre, Pécs, Hungary; ⁵Department of Anesthesiology and Intensive Therapy, University of Pécs, Medical School, Pécs, Hungary

Background: Microparticles (MPs) are shedding membrane vesicles released from activated blood and endothelial cells under inflammatory conditions. The role of endothelial MPs (EMPs) in pathophysiology of COPD is relatively well known. However, the release and function of MPs of other cellular origins, eg, platelets, red blood cells and leukocytes, are not clearly evaluated in COPD.

Purpose: The aim of this study was to measure EMPs and other cell-derived circulating MPs in stable and exacerbated COPD patients.

Patients and methods: A total of 50 patients with COPD and 19 healthy volunteers were enrolled in the study. EMPs (CD31+, CD62E+) and platelet-derived (CD61+, CD41+, CD42a+, PAC1+), red blood cell-derived (GlyA+) and leukocyte-derived (CD45+, CD13+, CD14+, CD56+) MPs were measured. Flow cytometry (FC) was performed on Beckman Coulter FC500 analyzer. MP reference gate was set using 0.3–0.5–0.9 μm microbeads with MP size gates of 0.5–1.0 μm .

Results: All the measured MPs were significantly ($P < 0.001$) higher in COPD patients than in the controls. Furthermore, CD62E+, CD41+, CD42a+ and CD14+ MP values were significantly ($P < 0.001$) increased in exacerbated COPD compared to stable COPD. These MPs showed significant ($P < 0.001$) inverse correlation with FEV_1/FVC , as well.

Conclusion: In this study, we describe a reliable flow cytometric assay for MP analysis that was successfully applied in COPD. Besides EMPs, COPD is accompanied by an increased concentration of various MPs in the systemic circulation; particularly, platelet- and monocyte-derived MPs seem to be important in exacerbation.

Keywords: cell-derived microparticles, biomarker, COPD, flow cytometry

Introduction

Microparticles (MPs) are defined as small (0.1–1.0 μm) lipid bilayer-limited microvesicular bodies with variable exposure of phosphatidylserine in their outer membrane leaflet. The membrane skeleton may be present, but the nucleus is absent and the bodies lack synthetic capacity. They are involved in intercellular communication, signal transduction and mediated receptor, virus and prion transfer. MPs are also known to take part in protein and mRNA/microRNA transport, waste management, coagulation, angiogenesis, inflammation and cell activation.^{1–3} MPs are released into the extracellular microenvironment during apoptosis, cell activation or exposure to shear stress in physiological or pathological conditions as inflammatory disorders.⁴ Nowadays, the quantity and the cellular origin of MPs are widely studied. Their cellular origin could be distinguished based on their surface protein's characteristics

Correspondence: Tihamér Molnár
Department of Anesthesiology and Intensive Therapy, University of Pécs, Ifjúság u 13, 7624 Pécs, Hungary
Tel +36 72 53 5832 ext 32420
Fax +36 72 50 3681
Email tihamermolnar@yahoo.com

as CD markers. The most relevant host cells are endothelial cells, platelets, red blood cells and leukocytes (neutrophils, monocytes, lymphocytes).⁵

Accumulating evidence suggests that cell injury in lung tissue is closely connected to disease progression in COPD. Due to the endothelial injury in the pulmonary capillary vasculature, endothelial MPs (EMPs) are now receiving attention as potential biomarkers for COPD. They might predict the presence, progression and degree of endothelial damage in COPD patients.⁶ The release of MPs from other cellular origins, eg, platelets, red blood cells and leukocytes, is not clearly understood in COPD. However, these cells are also activated during COPD pathophysiology, and COPD is also associated with several comorbidities and linked to systemic inflammation.^{7,8} Therefore, the role of MPs of various origins would be of great interest in understanding both the course of COPD and its effect on remote organ failure.

To detect and analyze MPs, different methods have been described, but due to technical variety and several difficulties, conflicting data have been reported.^{13–17} Nowadays, flow cytometry (FC) is the most frequently applied method in MP analysis, although there is no standard protocol for isolating and detecting circulating MPs from the plasma.

The aim of this study was to measure various MPs from different cellular origins in COPD patients with a reliable flow cytometric method for diagnostic purposes.

Patients and methods

Patients

The study protocol was approved by the Regional Research Ethical Committee, University of Pécs (3429/2009). Written informed consent was obtained from each patient and healthy subjects.

A total of 50 patients with COPD, who were treated at the 1st Department of Internal Medicine, Division of Pulmonology, University of Pécs, were recruited into this prospective clinical study. The diagnostic criteria and the GOLD stratification for COPD patients were made according to GOLD.⁹ Exclusion criteria in COPD patients were major factors that could significantly alter MP amounts such as hematological diseases, kidney diseases, cytostatic treatment in the past 30 days, patients with disseminated intravascular coagulation score of ≥ 5 and antiphospholipid syndrome.¹⁰ Besides, clinical factors (including smoking habits, comorbidities and medication) of patients, which could alter MP values, were recorded. Definition of exacerbated patient is as follows: hospital admission and intravenous corticosteroid therapy were urgently initiated based on the worsening of the symptoms such as

increased sputum, cough and signs of respiratory distress. COPD patients presenting for regular yearly checkup and without novel symptoms were considered as stable.

The data were compared to an age-matched control group consisting of 19 volunteers. The healthy state was assessed based on medical records, physical examination and laboratory data. The exclusion criteria were the same as in the COPD patient group.

Blood sampling

Anticoagulated, fasting venous blood samples were drawn with 21 G needles after short strangulation from the antecubital vein into 2.7 mL 3.8% (0.129 M) Na₃ citrate containing closed blood collection system tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Upon blood collection, the first 3 mL blood was collected in a separate vial and discarded. The blood samples for MP measurements were transported immediately to the laboratory and processed within 1 hour.

MP isolation and flow cytometric measurements

Currently, there is no standardized method for MP analysis. Because of this, and to avoid false-positive MP results, we developed a method for MP isolation as follows.

Blood was centrifuged at 800 $\times g$ for 20 minutes at room temperature to obtain platelet-rich plasma. Then, 1.5 mL supernatant was transferred into a new test tube and centrifuged at 1,500 $\times g$ for further 20 minutes to obtain platelet-poor plasma (PPP). Afterward, 1 mL PPP was further centrifuged at 1,500 $\times g$ for 20 minutes in a new polystyrene tube to obtain cell-free plasma. The top 500 μL of cell-free plasma was transferred into an Eppendorf tube and pelleted at 18,000 $\times g$ for 10 minutes. The supernatant was carefully removed leaving 25 μL of MP-rich plasma at the bottom of the Eppendorf tube. MPs were suspended with gentle vortexing for 20 seconds in 1.0 mL Apo-binding buffer (10 mmol/L HEPES-4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid [Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA], 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 136 mmol/L NaCl, pH = 7.4) without CaCl₂.

In this study, only Annexin V+ MPs were analyzed. We selected EMPs (CD31+, CD62E+) and platelet-derived (CD61+, CD41+, CD42a+, PAC1+), red-blood-cell-derived (GlyA+) and leukocyte-derived (CD45+, CD13+, CD14+, CD 56+) MPs. The selected CD markers, their cellular origin, the fluorescent dye used for labeling and the manufacturer's specification for our MP measurements are summarized in Table 1. The individual antibody cocktail tubes are listed in Table S1.

Table 1 CD markers used for MP measurements

CD marker	Cellular origin	Function	Fluorescent dye	Manufacturer
CD61	Platelet	Integrin β 3 chain with CD41 forms GPIIb/IIIa, receptor for fibrinogen, fibronectin, plasminogen, prothrombin, vitronectin, thrombospondin; with CD51 forms vitronectin receptor, role in cell adhesion without activation	FITC	Beckman Coulter
CD41	Platelet	Integrin α IIb chain with CD61 forms GPIIb/IIIa has a crucial role in coagulation	Cy5	Becton Dickinson
CD42a (GPIIb/IIIa)	Platelet	GPIX that forms receptor complex with GPIIb and GPV; von Willebrand factor and high-affinity thrombin-binding site	FITC	Becton Dickinson
PAC1 (GPIIb/IIIa)	Platelet (activation marker)	Present only on the surface of activated platelets, recognizes an epitope on the GPIIb/IIIa complex of activated platelets at or near the platelet fibrinogen receptor	FITC	Becton Dickinson
CD31 (PECAM-1)	Endothelial cell	PECAM-1, major constituent of endothelial intercellular junction, required for leukocyte trans-endothelial migration under inflammatory conditions	PE	Becton Dickinson
CD62E (ELAM-1/E-selectin)	Endothelial cell (activation marker)	ELAM-1, expressed on the surface of activated endothelial cells, mainly in inflammation	PE	Becton Dickinson
CD45	Leukocyte	Pan leukocyte marker	FITC	Beckman Coulter
CD13 (aminopeptidase N)	Leukocyte	Present on the surface of granulocytes and monocytes	PE	Beckman Coulter
CD14 (LPS-R)	Monocyte	LPS receptor, present on the surface of monocytes/macrophages	PE	Beckman Coulter
CD235 (glycophorin A)	Red blood cell	Present on the surface of red blood cells and their precursors	PE	Becton Dickinson
CD56 (NCAM)	NK cells, activated CD8+ T cells	Role in cell–cell adhesion	Cy5	Becton Dickinson
Annexin V	Recognizes phosphatidylserine	Present on the surface of activated and apoptotic cells	FITC, Cy5	Becton Dickinson
Mouse IgG1	Isotype control		FITC, PE, Cy5	Becton Dickinson

Note: Cellular origin and function of CD markers, fluorescent dye and the manufacturer's specification.

Abbreviations: Cy5, CyChrome (PE-Cy5 conjugate); ELAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule 1; FITC, fluorescein isothiocyanate; Ig, immunoglobulin; LPS, lipopolysaccharide; LPS-R, lipopolysaccharide receptor; NCAM, neural cell adhesion molecule; PE, phycoerythrin; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule.

For sample labeling, 10 μ L of MP suspension in Ca^{2+} -free buffer was incubated in 100 μ L Apo-binding buffer supplemented with 2.5 mmol/L CaCl_2 with total 10 μ L antibody, previously diluted to optimal labeling concentration. Staining was incubated for 30 minutes at room temperature in dark chamber. All buffers were filtered through 0.2 μ m membrane filters.

Flow cytometric analysis

The method described in International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) SSC standardization study with minor modifications was used for the flow cytometric MP analyses.^{11,12} Flow cytometric measurements and data analysis were performed on Beckman Coulter (Brea, CA, USA) FC-500 cytometer with CXP software. MP's reference gate

was defined using 0.3 μ m, 0.5 μ m and 0.9 μ m FITC-labeled polystyrene microbeads (Soft Flow Ltd., Pécs, Hungary). Side scatter, forward scatter and fluorescence channels were set in logarithmic scale. MP size gate was determined between 0.5 and 1.0 μ m size range. Events in the MP gate were further discriminated by labeling with Annexin V. MPs were defined as Annexin V-positive events in the MP gate with fluorescence intensity above the isotype control.

For the determination of the MP number, known concentration ($1 \times 10^5/\text{mL}$) of 3 μ m diameter microbeads (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) was used (Figure 1). To determine the optimal labeling concentrations, all antibodies and Annexin V were titrated. Labeling concentrations were defined by antibody staining of samples and sample-free buffers in the presence or absence of CaCl_2 . Labeling was

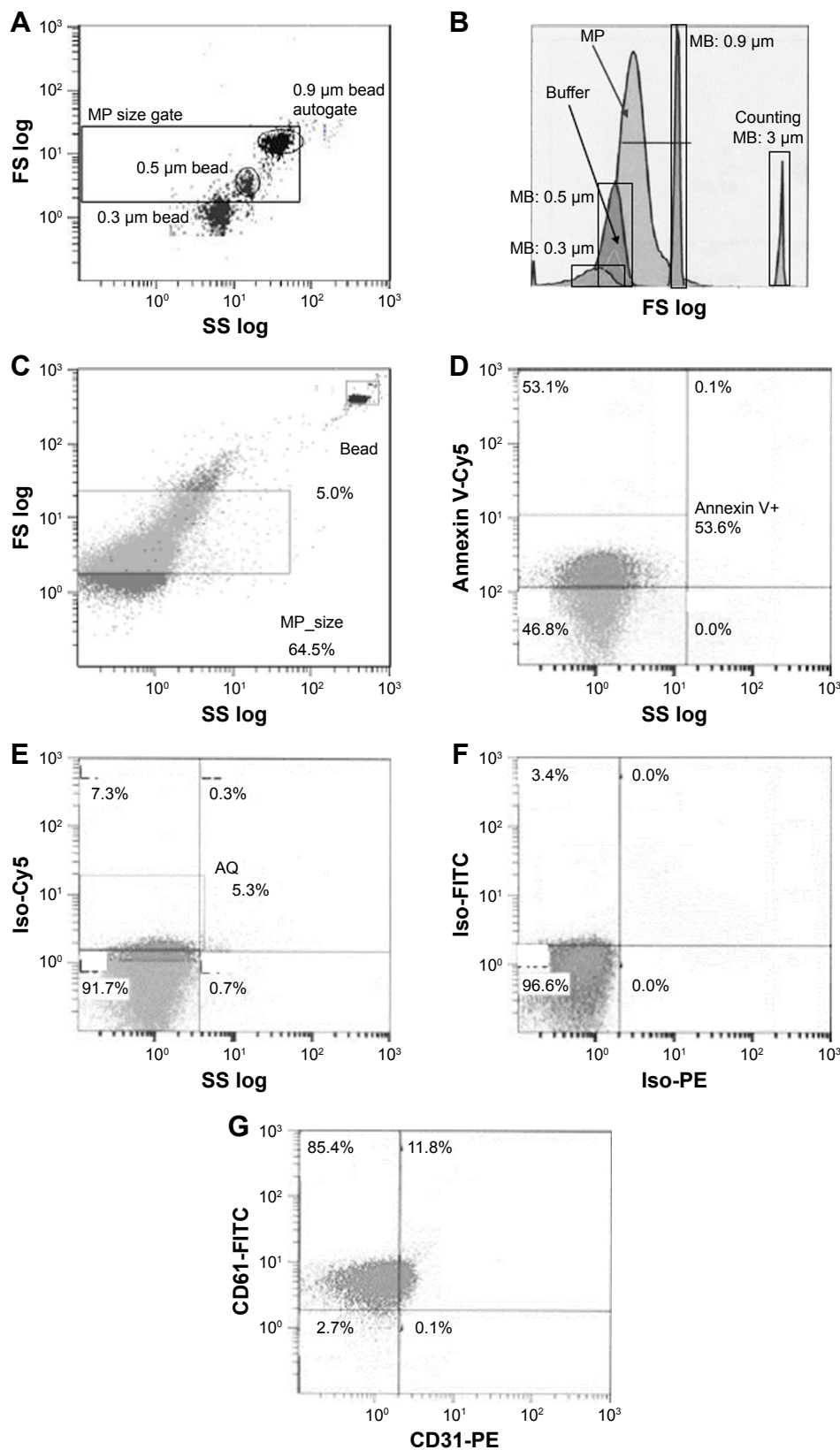


Figure 1 FC gating strategy used for MP measurement.

Notes: (A–C) MP size gate was determined using 0.3 μm , 0.5 μm , and 0.9 μm FITC-labeled polystyrene MBs. The lower side of the gate was set below 0.5 μm bead as a threshold, because the 0.3 μm and 0.5 μm bead histogram displayed an overlap indicating that the cytometer would not be able to discriminate individual MPs between these size ranges. The upper side of the gate was set at the upper and right sides of the 0.9 μm bead cloud. In this MP gate, the buffer and the sample containing MPs can be clearly distinguished. (D–G) MPs were defined as Annexin V+ events in the size gate, with fluorescence intensity above isotype control and the sample-free buffer.

Abbreviations: Cy5, CyChrome (PE-Cy5 conjugate); FC, flow cytometry; FITC, fluorescein isothiocyanate; FS, forward scatter; Iso, isotype; MB, microbeads; MP, microparticle; PE, phycoerythrin.; SS, side scatter.

considered optimal if CaCl₂-labeled sample measurement events were clearly distinguishable from background and CaCl₂-free staining as well as from isotype controls.

As a positive control, we used MPs isolated from pooled platelet-rich plasma after stimulation with calcium ionophore A23186 (Sigma-Aldrich Co., 25 µmol/mL). The pooled platelet-rich plasma was collected from healthy volunteers. Negative controls were MPs stained with Annexin V in the presence of 2.5 mmol/L EDTA.

Statistical analyses

Statistical analyses were done using SPSS 22 version for Windows (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). For investigating differences between patient groups, Mann–Whitney *U* test and Kruskal–Wallis test were used because of non-normal distribution of values. Chi-squared test was used to compare categorical variables. Correlation analysis was carried out using Spearman's test. Data are presented

as median (IQR). In calculations, $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Demographic and clinical data of COPD patients are summarized in Table 2. A total of 19 healthy subjects served as controls (nine males and 10 females) with the median age of 57 (49–63) years. The number of smokers was 8 (42%).

MPs in control subjects vs stable COPD patients

All the measured MPs such as CD31+ and CD62E+ with endothelial; CD61+, CD41+, CD42a+ and PAC1+ with platelet; GlyA+ with red blood cell, CD45+ and CD13+ with leukocyte; CD14+ with monocyte and CD56+ with lymphocyte origin showed significant ($P < 0.001$) elevation in stable COPD patients compared to controls (Table 3).

Table 2 Demographic and clinical data of COPD patients

	Stable COPD (n=34)	AECOPD (n=16)	P-value
Age (years) ^a	63 (54–70)	63 (56–67)	0.755
Male ^b	20 (59)	9 (56)	0.863
Chronic diseases			
DM ^b	2 (6)	5 (31)	0.03
CVD ^b	20 (58)	9 (56)	0.863
Smoking ^b	20 (59)	10 (62)	0.804
Medication			
Ca channel blockers ^b	8 (23)	10 (62)	0.009
β-blockers ^b	17 (50)	7 (44)	0.680
ACEI ^b	13 (38)	6 (37)	0.898
Statin ^b	2 (6)	3 (19)	0.320
ICS ^b	25 (74)	14 (87)	0.464
LABA ^b	26 (77)	14 (87)	0.698
LAMA ^b	32 (94)	14 (87)	0.245
Lung function			
FEV ₁ /FVC ^a	0.56 (0.41–0.63)	0.49 (0.37–0.55)	0.179
FEV ₁ ref% ^a	0.52 (0.36–0.67)	0.56 (0.45–0.67)	0.925
GOLD stage			
GOLD I–II ^b	21 (62)	10 (62)	0.96
GOLD III–IV ^b	13 (32)	6 (37)	0.96
Routine parameters			
Cholesterol ^a (mmol/L)	5.50 (5.00–6.80)	4.95 (4.10–6.10)	0.151
RBC count ^a (T/L)	4.89 (4.43–5.22)	4.99 (4.49–5.29)	0.677
PLT count ^a (G/L)	232 (172–276)	267 (195–328)	0.112
WBC count ^a (G/L)	7.55 (5.76–9.76)	13.53 (8.99–15.85)	<0.001
hs-CRP ^a (mg/L)	5.65 (3.50–8.30)	9.67 (2.93–23.61)	0.114

Notes: Median (IQR)^a and n (%)^b are presented. Mann–Whitney *U* test and chi-squared test were used to compare variables.

Abbreviations: ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; AECOPD, acute exacerbation of COPD; CVD, cardiovascular disease; DM, diabetes mellitus; G, giga; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; ICS, inhaled corticosteroid; LABA, long-acting β-agonist; LAMA, long-acting muscarinic antagonist; PLT, platelet; RBC, red blood cell; T, tera; WBC, white blood cell.

Table 3 Number of MPs in control subjects and patients with stable and AECOPD

CD markers ($\times 10^5/\text{mL}$)	Control group (n=19)	Stable COPD (n=34)	AECOPD (n=16)	P-value; control vs stable and control vs AECOPD	P-value; stable vs AECOPD
Annexin V+	2.18 (1.33–3.70)	53.74 (35.08–76.38)	61.15 (44.26–73.39)	<0.001	0.747
CD31+	0.79 (0.48–1.40)	10.35 (7.78–17.04)	15.59 (11.82–21.95)	<0.001	0.164
CD62E+	1.72 (0.97–3.17)	29.87 (26.85–40.58)	44.09 (33.43–59.21)	<0.001	0.011
CD61+	2.10 (1.22–3.65)	48.36 (32.02–73.68)	54.99 (38.18–65.73)	<0.001	0.992
CD41+	1.51 (0.90–2.46)	37.99 (32.69–52.59)	61.15 (44.25–73.39)	<0.001	0.018
CD42a+	0.17 (0.12–0.30)	1.32 (0.92–1.51)	3.19 (1.49–5.69)	<0.001	0.002
PAC1+	0.15 (0.09–0.23)	0.57 (0.28–3.05)	0.52 (0.15–0.76)	<0.001	0.182
GlyA+	0.28 (0.16–0.59)	8.21 (6.76–11.59)	11.93 (5.03–18.98)	<0.001	0.133
CD45+	1.88 (1.10–2.94)	37.67 (26.34–59.24)	43.21 (20.29–60.07)	<0.001	0.670
CD13+	1.62 (0.99–3.19)	30.37 (21.32–5,500)	41.44 (26.91–46.07)	<0.001	0.904
CD14+	0.07 (0.06–0.11)	0.29 (0.08–0.48)	0.624 (0.44–0.98)	<0.001	0.008
CD56+	1.02 (0.63–1.88)	43.99 (32.81–54.94)	61.15 (42.02–73.40)	<0.001	0.240

Notes: Median (IQR) data are presented. Kruskal–Wallis test was used to compare variables.

Abbreviations: AECOPD, acute exacerbation of COPD; MPs, microparticles.

MPs in stable vs acute exacerbation of COPD (AECOPD) patients

Importantly, we detected statistically significant differences in patients with AECOPD vs stable COPD patients: the number of CD62E+, CD41+, CD42a+ and CD14+ MPs was significantly ($P<0.05$) higher in the AECOPD group (Table 3). These endothelial-, platelet- and monocyte-derived MP numbers showed a remarkable elevation in acute exacerbation state of COPD patients.

After dichotomizing patients based on GOLD stages, an increased number ($P=0.031$) of PAC1+ MPs were observed in severe cases indicated by GOLD III and IV (Figure 2).

In addition, multivariate analyses showed that CD62E+, CD42a+ and CD14+ MPs correlate inversely with FEV_1/FVC (-0.406 , -0.473 , -0.440 , $P<0.001$, respectively).

Discussion

There is a growing evidence of applying MP analysis in the diagnostic process. However, the heterogeneity of the area makes it difficult to use MPs as potential biomarkers. A wide variety of sample preparation processes, in-house developments, different gating and measurement methods, diversity of the tested CD markers and small number of controls makes it almost impossible to compare the results of the research groups. There are no standard methods (solid phase capture techniques, electron microscopy, atomic force microscopy, transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and flow cytometry analysis) and standard protocols (different centrifugation time, cycles and forces, different sample types) for MP measurements.^{13–17}

Besides, there is no consensus on the use of MP-labeling antibodies. Different fluorochrome-labeled antibodies recognize different CD markers on the cell surface; however, these CD markers are represented in different densities. Consequently, the amounts of MPs can vary in wide ranges making results difficult to compare. It is also challenging to differentiate MPs from exosomes (30–100 nm) or apoptotic bodies (1–4 μm) during the workflow and analysis.

During our study, we successfully introduced a reliable flow cytometric method on Beckman Coulter FC500 flow cytometer for the measurement of MPs. Certainly, our

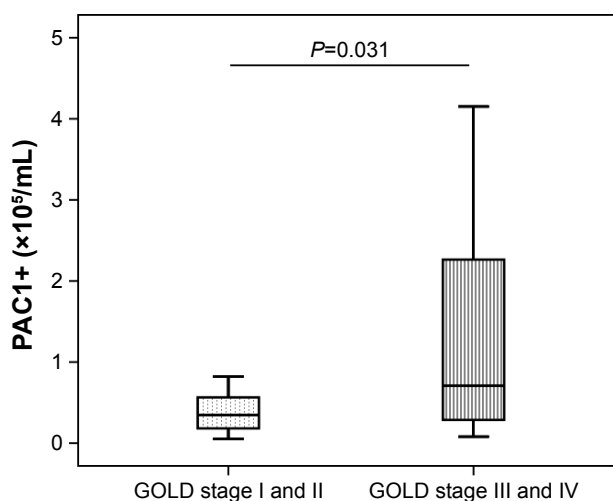


Figure 2 Comparison of PAC1+ MPs in patients with GOLD stage I–II vs stage III–IV.

Note: PAC1+ MP numbers are significantly increased in patients with GOLD stage III–IV compared to patients with GOLD stage I–II (data are presented as median and 25–75th percentiles, Mann–Whitney test, $P=0.031$).

Abbreviation: MPs, microparticles.

method has also some limitations. Besides the advantages of the method such as small sample size, relative wide availability and the capability to measure in parallel the number and the cellular origin of the MPs, the main disadvantage is the low size sensitivity. The FS (forward scatter) detector detects scattered light at an angle of 1° – 70° depending on the setup of the instrument.¹⁸ A higher collection angle reflects higher sensitivity.¹⁹ Most of the commercially available cytometers have an FS size limit around 0.5 μm due to the laser light wavelength (488 nm), restricting the accurate measurement of MPs in the lower size range. Consequently, only a fraction of MPs above this size can be detected with old type of cytometers.^{11,20} This limits the assessment of whole MP population taking into account that the MP size range is between 0.1 and 1.0 μm . New flow cytometers such as the Beckman Coulter (Brea, CA, USA) Gallios™, BD (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) FACSAria™ III, Apogee (Apogee Flow Systems Ltd, Northwood, England) A40/A50 are promising for the measurement of MP populations with lower size, because they have been designed to address this issue by increasing the FS collection angle.^{20–22}

The amount of studied MPs in our control group is in agreement with previous studies; however, due to technical variety, there is no international reference range for MP level.^{11,21,23} Moreover, some research groups use only platelet poor plasma (PPP), while others also pellet the MPs before labeling. Both PPP and PFP contain some residual platelet contamination, and thus this fact may affect the final MP count. Our protocol is capable of identifying only MPs without residual contamination and it is ideal for clinical investigations. Studies that present results about MPs in a certain patient population, such as COPD, provide useful information about their predictive value as a biomarker.

Studies to date have been focused only on EMPs in COPD; however, MPs from other origins may also play a pivotal role in COPD.^{24–26} It is known that MPs originating from platelets and monocytes may play an important role in the development and progression of COPD.²⁷ However, very limited data are available so far. To the best of our knowledge, this is the first study which investigates various MPs in COPD. In our study besides EMPs (CD31+, CD62E+), we analyzed the platelet-originating (CD61+, CD41+, CD42a+, PAC1+), red blood cell-originating (GlyA+) and leukocyte-originating (CD45+, CD13+, CD14+, CD56+) MP populations as well. Despite the relatively low number of cases, we found significant differences between COPD and the control group. Highly elevated MP levels can be interpreted as cell activation, tissue damage, inflammation and apoptosis which are known to be pathophysiologic processes in COPD.²⁸

Recently, EMPs have been described as possible pathogenic factors and prognostic markers of COPD and emphysema.^{25,26} We also found elevated CD62E+ MP values; moreover, exacerbated COPD patients showed higher levels than stable COPD. This finding is consistent with the observations of Takahashi et al²⁴ and could be explained by endothelial activation and vascular injury in the lungs during COPD.

A novel observation of our study that not only EMPs are elevated in exacerbated COPD but also platelet-derived CD41+ and CD42a+ and monocyte-derived CD14+ MPs also take a significant part in COPD exacerbations.

An inverse correlation with lung functions and the elevation in exacerbated cases could make them a candidate as potential predictive biomarker and confirm their role in COPD pathophysiology.

The causative role of such specific MPs in the pathophysiology of exacerbations still should be elucidated. In addition, these thrombo-inflammatory pathway-related MPs may also regulate the airway functions, because an inverse correlation was found between them and the lung function (FEV_1/FVC). In accordance with our findings, a negative correlation between endothelium-derived CD31+ MPs and FEV_1/FVC was recently observed in the sputum of COPD patients.²⁹ Although, MPs from the sputum were not investigated in our study, parallel measurement of MPs especially their kinetics in both the airway and the systemic circulation would clinically be worthwhile and elevations in exacerbated cases could make them candidates as potential predictive biomarkers.

Probably due to the low number of patients, we could not detect significant differences regarding smoking habits, medications and comorbidities. However, as it is suggested by other authors, these factors might increase MP values.^{26,30} COPD is also associated with several comorbidities, probably linked together through the systemic inflammation.^{7,8} Similarly, high levels of MPs with different cellular origins (platelet, leukocyte, endothelial) were described in CVD patients that may play different roles in cross talk between endothelial and other cell types and should be the potential effectors in inflammation and vascular injury.³⁰

Limitations of the study

Besides the relatively low number of cases, there are several limitations in our study: 1) in contrast to other sources of MPs, such as the sputum, blood cell-derived MPs were examined only in the systemic circulation here; 2) instead of single measurement, the kinetics of the MPs would be more informative; 3) MPs derived from airway epithelium were not investigated in our cohort.

Conclusion

This study presented a reliable method for MP analysis. Elevated MP values in exacerbated COPD patients may help to recognize disease progression and to start adequate therapy to achieve a better clinical outcome. However, to apply MPs as potential predictive biomarkers of COPD worsening and outcome, further studies are needed.

Acknowledgment

The experiments were supported by NKFI-EPR 115394, EFOP-3.6.2-16-2017-00009, EFOP-3.6.1.-16-2016- 00004 Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies and EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 at the University of Pécs

Author contributions

All authors contributed toward data analysis, drafting and revising the paper, gave approval of the final version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology*. 2005;20:22–27.
- Ullal AJ, Pisetsky DS, Reich CF. Use of SYTO 13, a fluorescent dye binding nucleic acids, for the detection of microparticles in in vitro systems. *Cytometry A*. 2010;77(3):NA–301.
- Vanwijk MJ, Vanbavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2003;59(2):277–287.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009;19(2):43–51.
- Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007;21(3):157–171.
- Takahashi T, Kubo H. The role of microparticles in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:303–314.
- Agusti A, Faner R. Systemic inflammation and comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2012;9(2):43–46.
- Divo M, Cote C, de Torres JP, et al. Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(2):155–161.
- Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017. Available from: <https://goldcopd.org>. Accessed October 13, 2018.
- Taylor FB, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M. Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. 2001;86(5):1327–1330.

- Robert S, Poncelet P, Lacroix R, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost*. 2009;7(1):190–197.
- Lacroix R, Robert S, Poncelet P, et al. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost*. 2010;8(11):2571–2574.
- Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004;2(10):1842–1843.
- van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost*. 2010;8(12):2596–2607.
- Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, et al. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):315–323.
- Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine*. 2011;7(6):780–788.
- Shet AS. Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(4):769–774.
- Picot J, Guerin CL, Le van Kim C, Boulanger CM. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012;64(2):109–130.
- van der Pol E, van Gemert MJ, Sturk A, Nieuwland R, van Leeuwen TG. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *J Thromb Haemost*. 2012;10(5):919–930.
- Chandler WL, Yeung W, Tait JF. A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost*. 2011;9(6):1216–1224.
- Nielsen MH, Beck-Nielsen H, Andersen MN, Handberg A. A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. *J Extracell Vesicles*. 2014;3(1):20795.
- Poncelet P, Robert S, Bouriche T, Bez J, Lacroix R, Dignat George F. Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter? *Cytometry Part A*. 2016;89(2):148–158.
- Gustafson CM, Shepherd AJ, Miller VM, Jayachandran M. Age- and sex-specific differences in blood-borne microvesicles from apparently healthy humans. *Biol Sex Differ*. 2015;6:10.
- Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, et al. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. *Thorax*. 2012;67(12):1067–1074.
- Thomashow MA, Shimbo D, Parikh MA, et al. Endothelial microparticles in mild chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Chronic Obstructive Pulmonary Disease study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(1):60–68.
- Gordon C, Gudi K, Krause A, et al. Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(2):224–232.
- Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11):1801.
- Nieri D, Neri T, Petrini S, Vagaggini B, Paggiaro P, Celi A. Cell-derived microparticles and the lung. *Eur Respir Rev*. 2016;25(141):266–277.
- Lacedonia D, Carpagnano GE, Trotta T, et al. Microparticles in sputum of COPD patients: a potential biomarker of the disease? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016;11:527–533.
- Tomaniak M, Gąsecka A, Filipiak KJ. Cell-derived microvesicles in cardiovascular diseases and antiplatelet therapy monitoring – A lesson for future trials? Current evidence, recent progresses and perspectives of clinical application. *Int J Cardiol*. 2017;226:93–102.

Supplementary material

Table S1 Individual antibody cocktails used for MP measurements

Tube	FITC-labeled CD markers	PE-labeled CD markers	Cy5-labeled CD markers
Tube 1	CD61 FITC	CD31 PE	Annexin V Cy5
Tube 2	Annexin V FITC	CD13 PE	CD41 Cy5
Tube 3	PAC1 FITC	CD14 PE	Annexin V Cy5
Tube 4	Annexin V FITC	GlyA PE	CD56 Cy5
Tube 5	CD42a FITC	CD62E PE	Annexin V Cy5
Tube 6	CD45 FITC	–	Annexin V Cy5
Tube 7	Iso FITC	Iso PE	Iso Cy5

Abbreviations: Cy5, CyChrome (PE-Cy5 conjugate); FITC, fluorescein isothiocyanate; MP, microparticle; PE, phycoerythrin.

International Journal of COPD

Dovepress

Publish your work in this journal

The International Journal of COPD is an international, peer-reviewed journal of therapeutics and pharmacology focusing on concise rapid reporting of clinical studies and reviews in COPD. Special focus is given to the pathophysiological processes underlying the disease, intervention programs, patient focused education, and self management protocols.

This journal is indexed on PubMed Central, MedLine and CAS. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-chronic-obstructive-pulmonary-disease-journal>